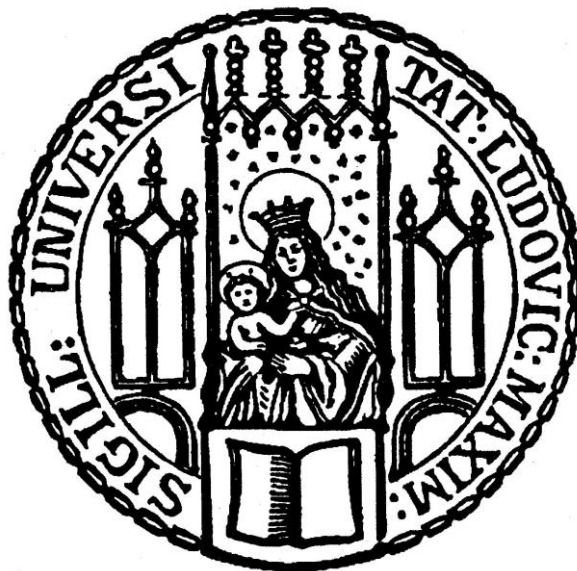


**Einfluss des *Pseudomonas aeruginosa* Quorum  
Sensing Moleküls *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-  
Homoserinlactons auf die Funktion humaner  
Dendritischer Zellen**

*Rodica Bernatowicz*



München 2014

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im  
Dr. von Haunerschen Kinderspital der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Einfluss des *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing  
Moleküls *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlactons auf die  
Funktion humaner Dendritischer Zellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Fakultät für Medizin der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Rodica Bernatowicz**  
aus Bochum

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Bohr  
Prof. Dr. Oliver Eickelberg

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2014

Für meine Eltern  
Andrea & Christoph Bernatowicz  
in Liebe und Dankbarkeit

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Zystische Fibrose.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Quorum Sensing.....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Das Quorum Sensing System von <i>P. aeruginosa</i> .....	15
1.3.2 Einfluss des <i>P. aeruginosa</i> Quorum Sensing Moleküls 3oxoC <sub>12</sub> -HSL auf menschliche Immunzellen .....	17
<b>1.6 Das Immunsystem.....</b>	<b>18</b>
1.6.1 Das angeborene Immunsystem .....	18
1.6.3 Dendritische Zellen .....	19
1.6.4 Rolle Dendritischer Zellen in der Immunabwehr .....	19
<b>1.7 Ziele dieser Arbeit.....</b>	<b>22</b>
<b>2. Material .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Geräte und Software.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Verbrauchsmaterial und Kulturgefäße .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Lösungen und Reagenzien.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Lösungen und Puffer für das Durchflusszytometer.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Antikörper .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie .....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 Kulturmedien .....</b>	<b>26</b>
<b>2.8 Seren.....</b>	<b>27</b>
<b>2.9 Stimulanzen.....</b>	<b>27</b>
2.9.1 Zytokine.....	27
2.9.2 LPS .....	27
2.9.3 Jonuleit Zytokin-Cocktail.....	27
<b>2.10 Mikroorganismen.....</b>	<b>28</b>
<b>2.11 <i>N</i>-(Acyl)-L-Homoserinlactone (AHL) .....</b>	<b>28</b>
<b>2.12 Kits .....</b>	<b>28</b>

<b>3. Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Herstellung und Aufbewahrung von AHL Aliquots.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Messung der AHL Bioaktivität.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Zellkultur.....</b>	<b>30</b>
3.3.1 Generierung humaner Dendritischer Zellen .....	30
3.3.1.1 Isolation von PBMZ und Anreicherung von Monozyten .....	30
3.3.1.2 Bestimmung der Zellzahl .....	31
3.3.1.3 Generierung unreifer Dendritischer Zellen .....	31
3.3.2 Stimulation unreifer Dendritischer Zellen mit AHL in Ab- und Anwesenheit von LPS bzw. JC .....	32
3.3.3 Ernte der reifen Dendritischen Zellen .....	33
<b>3.4 Antikörper-Färbung.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5 Durchflusszytometrie.....</b>	<b>34</b>
3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie.....	34
3.5.2 Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern .....	37
<b>3.6 Viabilitätstest.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7 Bestimmung der optimalen AHL Konzentration.....</b>	<b>39</b>
<b>3.8 Zytokinquantifizierung mittels Bio-Plex.....</b>	<b>40</b>
<b>3.9 Auswertung und Statistik.....</b>	<b>41</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Bestimmung der Bioaktivität der AHL.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Viabilitätstest AHL-stimulierter Dendritischer Zellen .....</b>	<b>43</b>
<b>4.3 Bestimmung der optimalen AHL Konzentration.....</b>	<b>44</b>
<b>4.4 Maturation Dendritischer Zellen mit AHL und LPS .....</b>	<b>45</b>
4.4.1 Prozentualer Anteil reifer Dendritischer Zellen .....	45
4.4.2 Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) reifer Dendritischer Zellen .....	47
4.4.3 Vergleich der beiden Messgrößen (Prozentualer Anteil und MFI) .....	49
<b>4.5 Maturation Dendritischer Zellen mit AHL und JC.....</b>	<b>51</b>
4.5.1 Prozentualer Anteil reifer Dendritischer Zellen .....	51
4.5.2 Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) reifer Dendritischer Zellen .....	53
4.5.3 Vergleich der beiden Messgrößen (Prozentualer Anteil und MFI) .....	55
<b>4.6 Zusammenfassung der Wirkung von AHL auf die Reifung Dendritischer Zellen</b>	<b>56</b>
<b>4.7 Einfluss der AHL auf die Zytokinsekretion Dendritischer Zellen .....</b>	<b>56</b>
4.7.1 Zytokinsekretion nach Maturation mit AHL und LPS .....	56
4.7.2 Zytokinsekretion nach Maturation mit AHL und JC.....	57
4.7.3 Vergleich der Wirkung von AHL auf die Zytokinsekretion in LPS- bzw. JC-stimulierten Dendritischen Zellen .....	59

<b>5. Diskussion.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Das <i>P. aeruginosa</i> Quorum Sensing Molekül 3oxoC<sub>12</sub>-HSL.....</b>	<b>60</b>
5.1.1 Vorkommen und Verteilung von 3oxoC <sub>12</sub> -HSL.....	60
5.1.2 Wirkungen von 3oxoC <sub>12</sub> -HSL auf Immunzellen.....	61
5.1.3 Wirkmechanismus von 3oxoC <sub>12</sub> -HSL .....	62
<b>5.2 Quorum Sensing-bezogene Therapieansätze.....</b>	<b>64</b>
<b>5.3 Generierung humaner Dendritischer Zellen .....</b>	<b>65</b>
<b>5.4 Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf die Reifung Dendritischer Zellen .....</b>	<b>66</b>
5.4.1 Expression von Oberflächenmarkern .....	66
5.4.2 Zytokinproduktion.....	67
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>84</b>
<b>9. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>87</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3oxoC <sub>12</sub> -HSL	<i>N</i> -(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton
3oxoC <sub>4</sub> -HSL	<i>N</i> -(3-Oxobutyryl)-L-Homoserinlacton
Abb.	Abbildung
AHL	<i>N</i> -(Acyl)-L-Homoserinlacton
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serum Albumin
BV	Beschleunigungsverzögerung
C <sub>12</sub> -HSL	<i>N</i> -(Dodecanoyl)-L-Homoserinlacton
CCL	engl.: Chemokine C-C motif Ligand
CCR	CC Chemokin Rezeptor
CD	engl.: Cluster of Differentiation
CFTR	engl.: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-
CXCR	CXC Chemokine Receptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dendritische Zelle
ELISA	engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>et al.</i>	et alteri
FACS	engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	engl.: Fetal Calf Serum
FI	engl.: Fluorescence Intensity
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	engl.: Forward Scatter
GFP	engl.: Green Fluorescence Protein
GM-CSF	engl.: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
h	Stunde



HLA	engl.: Human Leukocyte Antigen
HS	Humanserum
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JC	Jonuleit Zytokin-Cocktail
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MFI	engl.: Mean Fluorescence Intensity
MHC	engl.: major Histocompatibility Complex
min.	Minute(n)
MZ	Mastzellen
n	Zahl der Experimente
Na <sup>+</sup>	Natrium-
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
p	Signifikanzwert
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P.I.	Propidiumjodid
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMZ	Periphere Mononukleare Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte-Saline Lösung
PCL	Periciliary Liquid
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
pH	potentia Hydrogenii
QS	engl.: Quorum Sensing
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (engl.: rotor centrifugation force)
rhu	engl.: Recombinant Human
rpm	engl.: rounds per minute
SDF	engl.: Stromal Cell-Derived Factor
SSC	engl.: Sideward Scatter

Th	T-Helfer-Zelle
TLR	engl.: Toll-Like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
<i>V. fischeri</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
w/o	ohne (engl.: without)
ZF	Zystische Fibrose

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Abbildung einer Lungenepithelzelle
- Abbildung 2: Übersicht der Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*
- Abbildung 3: Synthese des *P. aeruginosa* QS-Moleküls 3oxoC<sub>12</sub>-HSL
- Abbildung 4: Gegenüberstellung von immaturren und aktivierten DZ
- Abbildung 5: Lichtstreuung bei der Durchflusszytometrie
- Abbildung 6: Punktwolkendarstellung von Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie
- Abbildung 7: Quadrantendarstellung der DZ-Population
- Abbildung 8: Vitalitätsmessung der DZ nach Kultivierung mit AHL (60 µM) mit und ohne Zugabe von JC
- Abbildung 9: Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83 und CD40 durch DZ nach Stimulation mit LPS (0,1 µg/ml) und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in den Konzentrationen 10 µM, 30 µM, 60 µM und 100 µM
- Abbildung 10: Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR und Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60 µM) mit und ohne LPS (0,1 µg/ml)
- Abbildung 11: Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR und Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60 µM) mit und ohne LPS (0,1 µg/ml)
- Abbildung 12: Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR und Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60 µM) mit und ohne JC
- Abbildung 13: Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR und Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60 µM) mit und ohne JC

- Abbildung 14: Zytokinsekretion (IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TNF-alpha) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60  $\mu$ M) mit und ohne LPS
- Abbildung 15: Zytokinsekretion (IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TNF-alpha) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60  $\mu$ M) mit und ohne JC

# 1. Einleitung

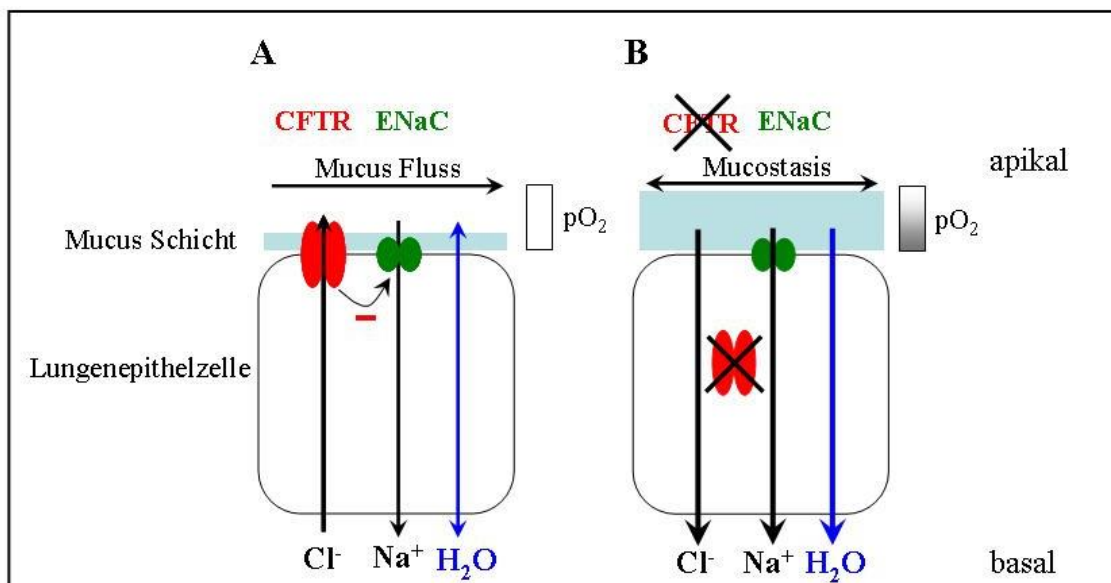
## 1.1 Zystische Fibrose

Zystische Fibrose (ZF), auch Mukoviszidose genannt, ist die häufigste angeborene, autosomal-rezessiv vererbte, letale Erkrankung in der weißen Bevölkerung. In Europa und Nordamerika sind etwa 60.000 Menschen von der Krankheit betroffen (Aris et al., 2005). Ursächlich für die Erkrankung ist eine Mutation des Gens, welches für das Transportprotein „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“ (CFTR) kodiert (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989). Das CFTR-Protein ist ein ABC-Transporter, welcher, abhängig von der Gewebeart, für die Chlorid-Ionen-Absorption bzw. -Sekretion in bzw. aus der Zelle verantwortlich ist (Reinhardt, 2001) und epitheliale Natriumkanäle reguliert (R C Boucher, 2002). Der Ionenkanal ist vorwiegend an der apikalen Membran von Epithelzellen lokalisiert und für deren Salz- und Flüssigkeitspermeabilität verantwortlich (Sheppard & M J Welsh, 1999). Die osmoaktiven Chlorid-Ionen ziehen bei ihrem Austritt aus der Zelle Wasser mit sich. Bei ZF-Patienten kommt es zum Teil zum vollständigen Funktionsverlust des CFTR und daher zu einer verminderten Ausscheidung von Chlorid-Ionen aus den Zellen und einer erhöhten Aufnahme von Natrium-Ionen in die Zellen exokriner Drüsen. Folge dessen ist ein herabgesetzter extrazellulärer Wassergehalt und eine erhöhte Viskosität der epithelialen Sekrete. Die zähflüssigen Sekrete führen zu Funktionsstörungen der betroffenen Organe, darunter vor allem des Gastrointestinaltrakts und Pankreas sowie der Lunge. CFTR findet sich auch auf Schweißdrüsen der Haut, wo es durch den Gendefekt zu einer vermehrten Chlorid-Sekretion kommt und damit zu einer erhöhten Chlorid-Konzentration im Schweiß. Diesen Umstand macht man sich klinisch-diagnostisch zu Nutze: Bei Verdacht auf ZF wird der Pilocarpin-Iontophorese-Schweißtest nach Gibson-Cooke (Gibson, 1959) durchgeführt, bei dem der Chloridgehalt im Schweiß gemessen wird. Als eindeutig pathologisch gilt eine Chlorid-Ionen-Konzentration im Schweiß von über 60 mmol/l (Farrell et al., 2008; Green & Kirk, 2007). Physiologisch ist eine Konzentration von unter 40 mmol/l.

Prognostisch ausschlaggebend für den Verlauf der Erkrankung ist das Ausmaß der pulmonalen Beteiligung. Verantwortlich für die mukoziliäre Clearance, also die kontinuierliche Reinigung der Atemwege von eingeatmeten Partikeln und Keimen, sind die

Mucus-sezernierenden, zilienträgenden Zellen des respiratorischen Epithels (Wanner, Salathé, & O'Riordan, 1996). Die Atemwege werden vom „Airway Surface Fluid“ (ASL) bedeckt, welches sich aus einer Mukusschicht und einem die Zilien umgebenden Flüssigkeitsfilm (periciliary liquid, PCL) zusammensetzt. Eine geringe Viskosität des PCL ist wichtig für die Beweglichkeit der Zilien. Physiologisch gesehen, handelt es sich beim ASL um eine isotone Flüssigkeit, deren Ionen-Gleichgewicht durch unterschiedliche Kanäle an der basalen und apikalen Zellmembran aufrecht erhalten wird (Knowles et al., 1997; Tarran, B R Grubb, Gatzky, Davis, & R C Boucher, 2001). Neben der mechanischen Clearance durch die Zilien, stellen antimikrobiell wirksame Peptide im ASL ein chemisches Schutzschild gegen eingedrungene Mikroorganismen dar (Joris, Dab, & Quinton, 1993). Das Fehlen des Ionenkanals CFTR bei ZF-Patienten führt zu einer verminderten Sekretion von  $\text{Cl}^-$ -Ionen aus der Zelle und einem gesteigerten Transport von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle (R C Boucher, 2004). Es kommt zum Schwund der PCL Schicht und zur Bildung von „konzentrierten“, eingedickten Mucus-Plaques, wodurch die Zilienbeweglichkeit und demzufolge die mukoziliäre Clearance beeinträchtigt werden (H Matsui et al., 1998). Die Ansammlung von zähem Schleim führt zur Obstruktion der Atemwege und verhindert die primäre Abwehr von Mikroorganismen (McAuley & Elborn, 2000). Dieses Milieu bietet optimale Voraussetzungen für die Besiedlung mit opportunistischen Keimen und Entwicklung chronischer Infektionen (R C Boucher, 2002). Im Schutz der Mucus-Plaques sind die Keime in der Lage, sich der chemischen und zellulären Abwehr durch antimikrobielle Substanzen bzw. Phagozyten zu entziehen (Hirotooshi Matsui et al., 2005). Die chronisch-progressiven bronchopulmonalen Entzündungen führen im Laufe der Zeit zur respiratorischen Insuffizienz (Balough et al., 1995) und sind ursächlich für die hohe Morbidität and frühe Mortalität von ZF-Patienten (Oliver, Alarcón, Caballero, & Cantón, 2009). So stellt Lungenversagen mit 90% die häufigste Todesursache von ZF-Patienten dar (Rajan & Saiman, 2002).

Neben *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* (Gibson, Burns, & Ramsey, 2003; Paixão et al., 2010) ist *Pseudomonas aeruginosa* der vorherrschende Erreger pulmonaler Infektionen bei ZF-Patienten (Oliver, Alarcón, Caballero, & Cantón, 2009).



**Abb. 1: Schematische Darstellung einer Lungenepithelzelle** eines gesunden Menschen (A) und eines ZF-Patienten (B). Der Defekt des CFTR-Rezeptor führt zur Umkehr des Chlorid-Ionen Flusses und demzufolge vermehrten Eintritt von Natrium-Ionen und Wasser in die Zelle. Durch den Wasserentzug nimmt die Mucus Viskosität zu und es kommt zur Mucostasis.

## 1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein opportunistisches Bakterium und Hauptursache für die erhöhte Morbidität und frühe Sterblichkeit von ZF-Patienten. Bis zu 80% der über 25 jährigen ZF-Patienten weisen eine Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* auf (Schechter, 2008). Der opportunistische, gram-negative Keim gehört zur Klasse der Gammoproteobakterien und zeichnet sich durch seine hohe Widerstandsfähigkeit und niedrigen Nährstoffansprüche aus. Diese Eigenschaften befähigen ihn zum Überleben unter extrem ungünstigen Bedingungen. Als sogenannter Nasskeim findet man ihn v.a. im Boden, in Oberflächengewässern, auf Pflanzen und Tieren aber auch als physiologische Flora im menschlichen Darm (Kenneth, 2008). Bei abwehrgeschwächten Individuen, wie z.B. lange hospitalisierte Patienten oder Menschen mit einer Immunschwäche, verursacht *P. aeruginosa* oft schwerwiegende, chronische Infektionen. Als Infektionsquellen dienen Infusionsschläuche, Beatmungsgeräte, Waschbecken, aber auch Lebensmittel und Kosmetika (Döring, Hörz, Ortelt, Grupp, & Wolz, 1993; Nseir et al., 2002; Svediene & Ivaskevicius, 2006).

Zwar gilt *P. aeruginosa* als obligat aerober Keim, doch kann er sich in Abwesenheit von Sauerstoff des Pyruvats, Arginins oder oxidierter Stickstoffverbindungen (Zumft, 1997) als

Elektronenakzeptoren bedienen und ist somit in der Lage, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen (Eschbach et al., 2004). Darüber hinaus verfügt *P. aeruginosa* über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren und die Fähigkeit zur Biofilm-Bildung (Abb. 2). Mittels Proteasen (alkalische Phosphatase, Elastase A und B), Hämolysinen (Phospholipase, Rhamnolipid), Lipopolysacchariden (LPS), Exoenzym S und Histamin schützt er sich vor Angriffen von außen (Wilson & Dowling, 1998). Der Keim dringt in unterbelüftete Lungenregionen vor, bindet mit Hilfe von Pili und Exoenzym S an das Alveolarepithel und formt Mikrokolonien. Durch die Sekretion von Exotoxin A, einer ADP-Ribosyltransferase, wird in eukaryotischen Zellen die Proteinbiosynthese gehemmt und Apoptose induziert. Der Keim nutzt das Typ III Proteinsekretionssystem um über eine Pore oder nadelartige Struktur seine Effektorproteine in die Wirtszelle einzuschleusen (Engel & Balachandran, 2009). In klinischen Isolaten von *P. aeruginosa* von ZF-Patienten fand sich eine erhöhte Konzentration des Exopolysaccharids Arginat, welches ein essentieller Bestandteil von Biofilmen ist. Verantwortlich für die übermäßige Produktion von Arginat in diesen Fällen ist eine Mutation im Erbgut des Erregers, der sich von seiner ursprünglich beweglichen zu einer mukoiden, nicht-mobilen Form entwickelt (Hassett et al., 2009; Yoon & Hassett, 2004). Dank dieser Mutation ist der Keim in der Lage, sich mit einem Biofilm aus Arginat und anderen Polysacchariden zu umgeben, der ihn für Phagozyten (Schwarzmann & Boring, 1971) und Antibiotika (Govan & Fyfe, 1978) kaum zugänglich macht. Auf diese Weise kommt es zur persistierenden Besiedelung und chronischen Infektionen der Lunge durch *P. aeruginosa* (Drenkard, 2003; Whiteley et al., 2001), und als Folge, zu frühzeitiger Sterblichkeit der betroffenen Patienten.



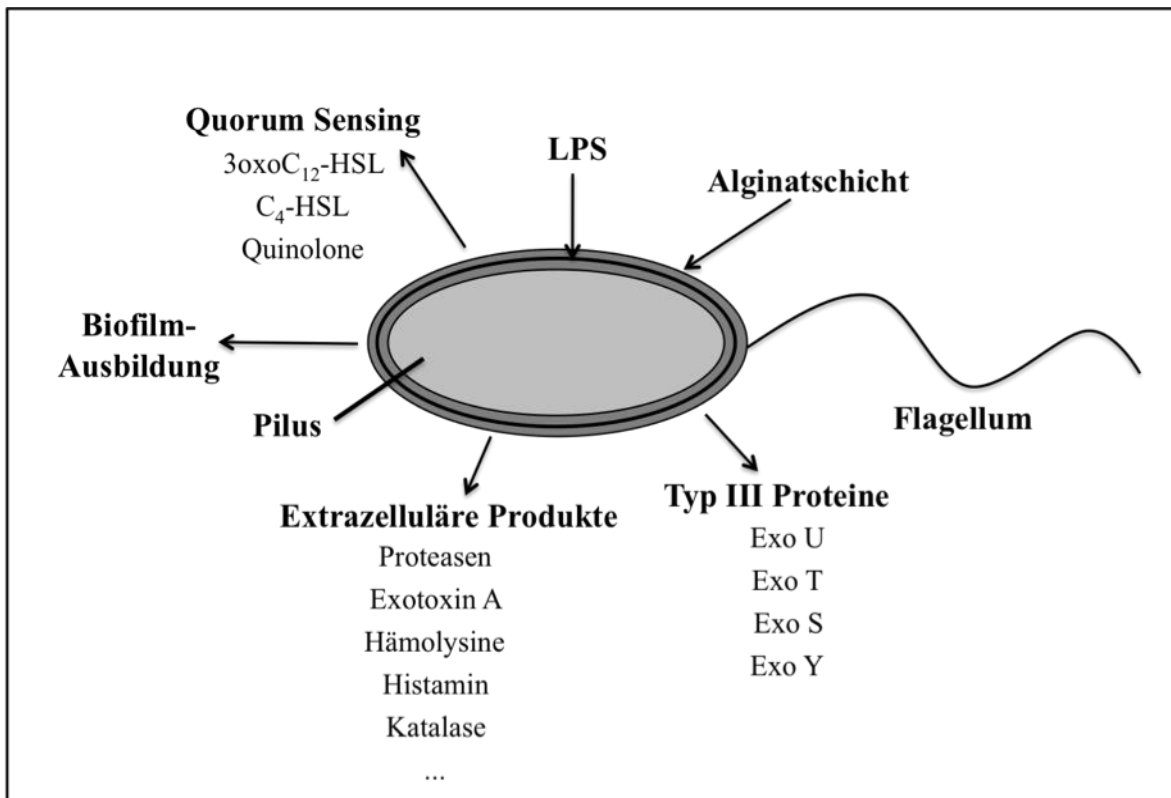


Abb. 2: Übersicht der Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa*

### 1.3 Quorum Sensing

Als „Quorum Sensing“ (QS) bezeichnet man die Fähigkeit von Bakterien, mithilfe spezieller Signalmoleküle, sogenannter Autoinduktoren, untereinander zu kommunizieren. Dieses interzelluläre Kommunikationssystem ermöglicht es den Bakterien, abhängig von der Dichte der Bakterienpopulation, bestimmte Abläufe, wie z.B. die Produktion von Virulenzfaktoren, zu koordinieren (Waters & Bassler, 2005). Die extra- und intrazelluläre Konzentration der sezernierten Autoinduktoren korreliert mit der Größe der Population (das „Quorum“). Die Bakterien können so „abschätzen“ („Sensing“), ob die Expression von Pathogenitätsgenen und weiterer Signalmoleküle für ihr Wachstum von Vorteil ist. Ist die Bakterienpopulation klein und damit die Konzentration an Autoinduktoren gering, werden kaum Virulenzfaktoren exprimiert, da der Keim dem Wirtsorganismus unterlegen ist. Findet sich allerdings eine ausreichende Bakterienzahl, lohnt sich der energetisch hohe Aufwand der Produktion von Virulenzfaktoren mit dem Ziel, den Wirt und dessen Abwehrmechanismen zu bekämpfen, so dass sich die Bakterienpopulation weiter ausbreiten kann.

Zuerst beschrieben wurde Quorum Sensing bei dem biolumineszenten Meeresbakterium *Vibrio fischeri* (Kaplan & E P Greenberg, 1985). *V. fischeri* ist ein häufiger Symbiont von Tintenfischen oder Heringen und besiedelt deren Leuchtorgane. Während der nächtlichen Nahrungssuche laufen die Fische Gefahr, anderen Meeresbewohnern zum Opfer zu fallen, da sie sich von der vom Mondlicht erleuchteten Meeresoberfläche als dunkle Schatten abheben. Schutz bietet die Fähigkeit ihres Symbionten zur Biolumineszenz: Erreicht die *V. fischeri*-Kolonie eine Größe von etwa  $10^{11}$  Zellen/ml, beginnen die einzelnen Bakterien die Synthese *Luciferase* zu exprimieren, welche in Anwesenheit von Sauerstoff das intrazelluläre Protein *Luciferine* zu *Oxoluciferine* oxidiert. Bei dieser Reaktion kommt es zur Biolumineszenz, d.h. die Bakterien beginnen zu leuchten (Hastings, Potrikus, Gupta, Kurfürst, & Makemson, 1985). Die Expression der zur Biolumineszenz notwendigen Proteine wird durch Autoinduktoren, also Quorum Sensing Moleküle, vermittelt. Über einen positiven Feedback-Mechanismus wird dabei auch die Produktion weiterer Autoinduktor-Moleküle gesteigert.

### 1.3.1 Das Quorum Sensing System von *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* bedient sich des Quorum Sensing, um die Expression seiner Virulenzfaktoren zu regulieren (Fuqua, Winans, & E P Greenberg, 1996). Der Keim verfügt über zwei QS-Systeme, Las und Rhl, welche sich gegenseitig beeinflussen (Pesci, J. P. Pearson, Seed, & B H Iglewski, 1997). Die Systeme setzen sich zusammen aus jeweils einem Transkriptionsregulator (LasR bzw. RhlR) und einer Synthase (LasI bzw. RhlI), welche gemeinsam die Synthese der Signalmoleküle katalysieren.

Strukturchemisch betrachtet, handelt es sich bei den QS-Molekülen um acylierte Homoserinlactone (AHL), welche zellwandgängig sind und passiv entlang eines Konzentrationsgradienten langsam in und aus den Bakterien diffundieren. 3oxoC<sub>12</sub>-Homoserinlacton (HSL) wird zudem auch aktiv über eine Efflux-Pumpe aus der Zelle hinaus transportiert (J. P. Pearson, Van Delden, & B H Iglewski, 1999). Die LasR-LasI-Einheit synthetisiert das langkettige *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton (3oxoC<sub>12</sub>-HSL) (Abb. 1.2). Dabei kodiert das *lasI*-Gen für die 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-Synthase LasI und das *lasR*-Gen für das Regulatorprotein LasR (J. P. Pearson et al., 1994). Analog verläuft die Synthese des zweiten *P. aeruginosa* QS-Moleküls, dem kurzkettigen *N*-(Butanoyl)-L-Homoserinlacton (C<sub>4</sub>-HSL), welches vom RhlR-RhlI-System gebildet wird (J. P. Pearson, L Passador, B H Iglewski, & E P Greenberg, 1995). In diesem Fall ist die C<sub>4</sub>-HSL-Synthase RhlI das Genprodukt von *rhlI* und das Transkriptionsregulatorprotein RhlR Genprodukt von *rhlR*. Binden 3oxoC<sub>12</sub>-HSL oder C<sub>4</sub>-HSL an ihren jeweiligen Transkriptionsregulator (LasR bzw. RhlR), formt sich ein Autoinduktor-Regulatorprotein-Komplex. Diese transkriptionsregulatorische Einheit führt zu einer zunehmenden Transkription des *lasI*- bzw. *rhlI*-Gens und einer daraus resultierenden verstärkten Signalmolekül-Produktion. Die Signalmoleküle induzieren in ihrer Funktion als Autoinduktoren neben der Synthese weiterer QS-Moleküle auch die Transkription von *P. aeruginosa*-Genen, die für Virulenzfaktoren kodieren (Gambello & B H Iglewski, 1991; Schuster, Lostroh, Ogi, & E P Greenberg, 2003; V. E. Wagner, Bushnell, Luciano Passador, Brooks, & Barbara H Iglewski, 2003).

Beide *P. aeruginosa* QS-Systeme interagieren miteinander, wobei die LasR-LasI-Einheit der RhlR-RhlI-Einheit übergeordnet ist. Der 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-LasR-Komplex steigert neben der Transkription des *lasI*-Gens auch die des *rhlI*-Gens (Pesci, J. P. Pearson, Seed, & B H Iglewski, 1997). Wird also das LasR-LasI-System aktiviert kommt es in der Folge auch zur Aktivierung des RhlR-RhlI-Systems mit Expression von C<sub>4</sub>-HSL.

Hemmenden Einfluss auf die Transkription von *lasI* hat das Protein RsaL. Dabei handelt es sich um das Genprodukt einer Sequenz (*rsaL*) des *P. aeruginosa*-Genoms, die dem *lasR* nachgeschaltet ist. RsaL unterdrückt die Synthese 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-LasR-induzierter Virulenzfaktoren und verringert auf diese Weise das Pathogenitätspotential von *P. aeruginosa* (de Kievit, Seed, Nezezon, L Passador, & B H Iglewski, 1999).

Zwar scheinen AHL nicht ursächlich an der Entstehung von Biofilmen beteiligt zu sein, doch benötigt *P. aeruginosa* sein AHL 3oxoC<sub>12</sub>-HSL für die Differenzierung zu Biofilmbildenden multizellulären Strukturen. Weiterhin wurde gezeigt, dass AHL Einfluss auf die Beschaffenheit der Biofilme haben. Die Abwesenheit von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL führte zur Ausdünnung und Empfindlichkeit des Biofilms gegenüber Detergenzien (Davies et al., 1998).

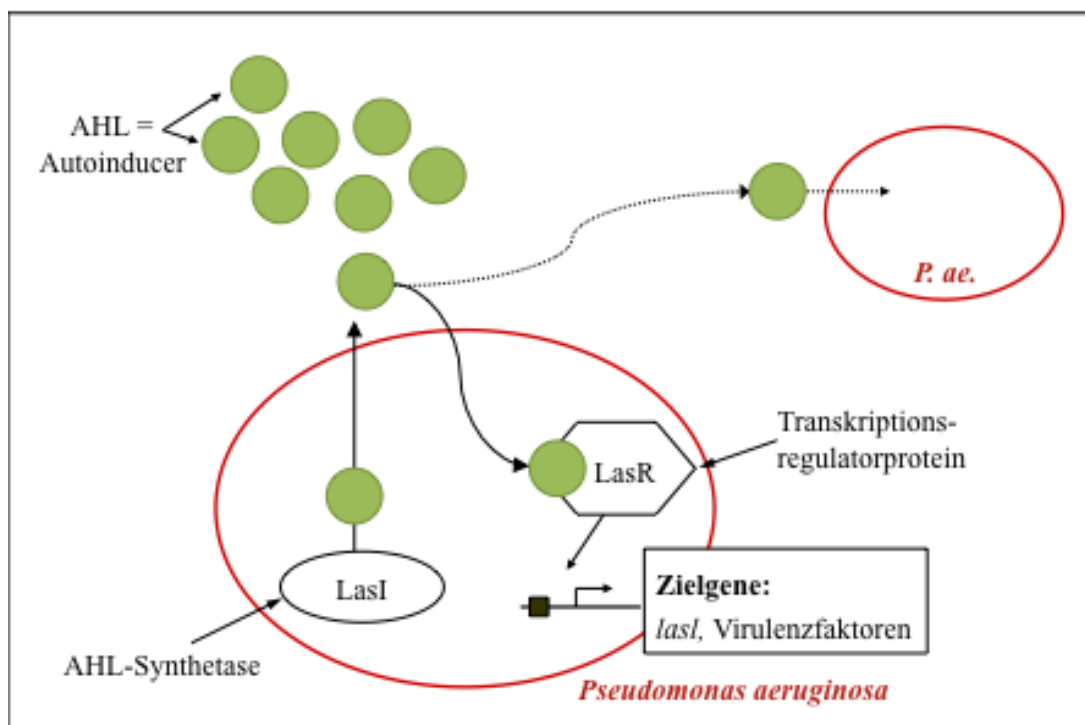


Abb. 3: Synthese des *P. aeruginosa* QS-Moleküls 3oxoC<sub>12</sub>-HSL

### 1.3.2 Einfluss des *P. aeruginosa* Quorum Sensing Moleküls 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf menschliche Immunzellen

Die QS-Moleküle haben neben ihrer Funktion als interbakterielle Signalstoffe auch modulierende Einflüsse auf die menschliche Immunantwort (M. Cooley, Chhabra, & Paul Williams, 2008; Hooi, Barrie W Bycroft, Chhabra, Paul Williams, & David I Pritchard, 2004). So wurde gezeigt, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL die Sekretion von Interleukin (IL)-12 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  aus LPS-stimulierten Makrophagen sowie die Proliferation von T-Zellen hemmt (G Telford et al., 1998). Die Typ2-T-Helferzellen (Th2)-abhängige Ausschüttung von Antikörpern stieg hingegen in Anwesenheit von niedrigen mikromolaren Konzentrationen von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL.

Während *P. aeruginosa* über seine Oberflächenmoleküle (z.B. LPS) die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus Makrophagen auslöst und auf diese Weise T-Zellen und Phagozyten aktiviert, zeigt sein QS-Molekül 3oxoC<sub>12</sub>-HSL eine dem entgegen gesetzte Wirkung. Die TNF- $\alpha$ -Sekretion durch murine Makrophagen *in vitro* wurde nach Zugabe von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL supprimiert (G Telford et al., 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL die Proliferation und Funktion stimulierter T-Lymphozyten hemmt (Chhabra et al., 2003; A J Ritchie et al., 2005) und die Antikörper-Produktion durch B-Zellen beeinträchtigt (Adam J Ritchie, Yam, Tanabe, Rice, & Margaret A Cooley, 2003). Die bisherigen Untersuchungen deuten also darauf hin, dass *P. aeruginosa* über 3oxoC<sub>12</sub>-HSL die Th2-abhängige Aktivierung von B-Lymphozyten unterdrückt und damit eine wirtsprotektive Antikörper-vermittelte Immunantwort verhindert. Unter dem Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL verschiebt sich daher das Th1-Th2-Zell-Verhältnis zugunsten der Th1-Antwort und es wird eine weniger wirkungsvolle Zell-vermittelte Immunantwort generiert. Widersprüchliche Ergebnisse ergaben sich aus Versuchen mit humanen neutrophilen Zellen: Während Zimmermann und Kollegen einen chemotaktischen und aktivierenden Effekt von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf Neutrophile beobachteten (C. Wagner et al., 2007; Zimmermann et al., 2006), zeigten andere Gruppen, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zytotoxisch auf Makrophagen und Neutrophile wirkt und deren Apoptose induziert (Kazuhiro Tateda et al., 2003). Für C<sub>4</sub>-HSL konnte keiner dieser Effekte nachgewiesen werden.

## **1.6 Das Immunsystem**

### **1.6.1 Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem ist ein universelles, unspezifisches Abwehrsystem von Säugetieren, Insekten und Pflanzen (Hoffmann, 1999). Es stellt demnach einen entwicklungsgeschichtlich alten Teil der Abwehr dar, da es sich noch vor Trennung von Pflanzen- und Tierreich entwickelt haben muss. Es ist die erste Instanz, die sich mit in den Wirtsorganismus eingedrungenen Pathogenen auseinandersetzt und in der Lage, innerhalb weniger Minuten zu reagieren (Medzhitov, 2001). Das angeborene Immunsystem setzt sich zusammen aus gelösten Stoffen, Zellen und im weiteren Sinne der Haut und Epithelien als äußere und innere mechanische und chemische Barrieren (z.B. Säureschutzmantel und respiratorisches Flimmerepithel). Vertreter der zellulären, unspezifischen Abwehr sind Leukozyten, die nicht zu den T- oder B-Lymphozyten zählen, also Makrophagen, neutrophile Granulozyten (kurz: Neutrophile), eosinophile Granulozyten (kurz: Eosinophile) und Dendritische Zellen (DZ) (Medzhitov, 2001). Diese Zellen werden durch körperfremde Antigene aktiviert, welche sie durch Phagozytose aufnehmen. Die Aktivierung äußert sich in einer Differenzierung der Zellen zu kurzlebigen Effektorzellen, deren Aufgabe und Ziel eine möglichst rasche Bekämpfung des eingedrungenen Pathogens ist. Sind die Zellen des unspezifischen Immunsystems nicht in der Lage, eine Infektion in Griff zu bekommen, aktivieren sie das erworbene, spezifische Abwehrsystem. Als Mittler zwischen beiden Komponenten des Immunsystems dienen spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen (APZ), allen voran Dendritische Zellen (Janeway, C.A., Travers, P. & Walport, 2009).

### 1.6.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) sind hochspezialisierte, antigenpräsentierende Zellen, die in dieser Funktion eine Mittlerrolle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem einnehmen. Zuerst beschrieben wurden sie 1686 von Paul Langerhans, der die in der Epidermis gelegenen Zellen allerdings als Nervenzellen fehl deutete (Langerhans, 1868). 100 Jahre später isolierten Steinman und Cohn Zellen aus der Milz von Mäusen und bezeichneten sie aufgrund ihrer langgestreckten verzweigten Fortsätze als „Dendritische Zellen“ (Steinman & Cohn, 1973). DZ entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen, den  $CD34^+$  DZ-Vorläuferzellen im Knochenmark (Shortman & Y. Liu, 2002). Die Gesamtheit der DZ stellt eine sehr heterogene Population dar. Die einzelnen Subgruppen differieren in der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker untereinander. So unterscheidet man  $CD11c^+/CD1b^+$  myeloide und  $CD123^+$  plasmazytoide DZ (MacDonald et al., 2002). Die später charakterisierten plasmazytoiden DZ tragen weniger MHC I-Moleküle auf ihrer Oberfläche und spielen durch eine hohe Produktion von Typ 1 Interferon (IFN) eine tragende Rolle bei der antiviralen Immunantwort (Colonna, Giorgio Trinchieri, & Y.-J. Liu, 2004; Siegal et al., 1999). Myeloide, auch konventionelle DZ genannt, können *in vitro* aus verschiedenen Vorläuferzelltypen gewonnen werden. Dazu gehören  $CD14^+$  periphere Monozyten im Blut, dermale oder interstitielle DZ und epidermale Langerhans-Zellen (Rossi & Young, 2005).

Die Gewinnung ausreichender Mengen humaner DZ *ex vivo* stellt sich allerdings als sehr schwierig dar (León, López-Bravo, & Ardavín, 2005). Im Jahre 1994 gelang es Sallusto und Lanzavecchia, mittels Isolierung und Kultivierung peripherer Blutmonozyten mit Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) humane myeloide DZ *in vitro* zu generieren (F Sallusto & A Lanzavecchia, 1994). Diese Methode kam auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung.

### 1.6.4 Rolle Dendritischer Zellen in der Immunabwehr

Über das Blut gelangen unreife DZ in periphere Gewebe wie Haut, Schleimhäute, Lunge und Verdauungsorgane. Hier, und in geringen Mengen im Blut, nehmen sie die Funktion von Wächterzellen wahr und durchwandern ihre Umgebung fortwährend auf der Suche nach körperfremden Antigenen. Unreife DZ verfügen über wenige MHC Klasse II- und

T-Zell-stimulierende Moleküle und zeigen eine geringe Expression des Oberflächenmarkers CD83 (L. J. Zhou & Tedder, 1995).

In diesem Zustand besitzen DZ ein hohes phagozytotisches Potential (Banchereau et al., 2000). Sie sind in der Lage neben relativ kleinen gelösten Peptiden auch größere Partikel wie Zellfragmente, Parasiten und Viren und Bakterien (Reis e Sousa, Sher, & Kaye, 1999) mittels Phagozytose, Makro- oder Mikropinozytose (F Sallusto, Cella, Danieli, & A Lanzavecchia, 1995) oder über rezeptorvermittelte Endozytose aufzunehmen. Darüber hinaus binden DZ opsoniertes Material und Immunglobulinkomplexe an ihre Fc-gamma-Rezeptoren CD64 (Typ I) und CD32 (Typ II) (Fanger, Wardwell, Shen, Tedder, & Guyre, 1996). Ein weiterer Weg der Antigenaufnahme führt über transmembranäre Toll-like-Rezeptoren (TLR), die Pathogen-assoziierte Strukturmoleküle erkennen (Tsuneyasu Kaisho & Shizuo Akira, 2002). Die TLR unterscheiden sich in dem Antigenspektrum, welches sie erkennen: So binden TLR2 Lipoproteine und -peptide sowie Peptidoglycane gram-positiver Bakterien (Hertz et al., 2001), TLR4 dagegen Lipopolysaccharide gram-negativer und Lipoteichonsäuren gram-positiver Bakterien (T Kaisho & S Akira, 2001). TLR7 spielt eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung viraler Erreger (Hemmi et al., 2002). Das aufgenommene Antigen wird in der DZ zu einem Peptid degradiert, prozessiert, an MHC-I- oder II-Moleküle gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert (Cella, Engering, Pinet, Pieters, & A Lanzavecchia, 1997; K. Inaba et al., 2000).

Erkennen DZ ein Pathogen bzw. eingedrungenes Antigen als „fremd“, werden sie aktiviert und wandern über die Lymphe zu lymphatischen Organen. Die Morphologie und Funktion aktivierter DZ verändert sich durch deren Reifung (Abb. 3). So verlieren sie ihre Fähigkeit zur Phagozytose (Théry, 2001), steigern die Expression von MHC- Molekülen und costimulatorischen Oberflächenmarker wie CD83, CD80, CD86 und ICAM-1 (CD54) (K. Inaba et al., 1995; Larsen et al., 1994; Lechmann, Zinser, Golka, & Steinkasserer, 2002; Steinman, 1991). Mittels dieser Signalmoleküle sind DZ in der Lage naive T-Zellen und das erworbene Immunsystem zu aktivieren. Außerdem kommt es zur verstärkten Ausbildung des Chemokin-Rezeptors CCR7, dank welchem DZ entlang eines Chemokin-Gradienten zu Lymphknoten wandern (Saeki, A. M. Moore, Brown, & Hwang, 1999). Deren Endothelzellen bilden die CCR7- Liganden SLC (CCL21) und ELC (CCL19, MIP-3-beta) (Gunn et al., 1999). Ausdruck der morphologischen Veränderung reifer DZ ist die Ausbildung von langgestreckten zytoplasmatischen Ausläufern, den namensgebenden „Dendriten“.



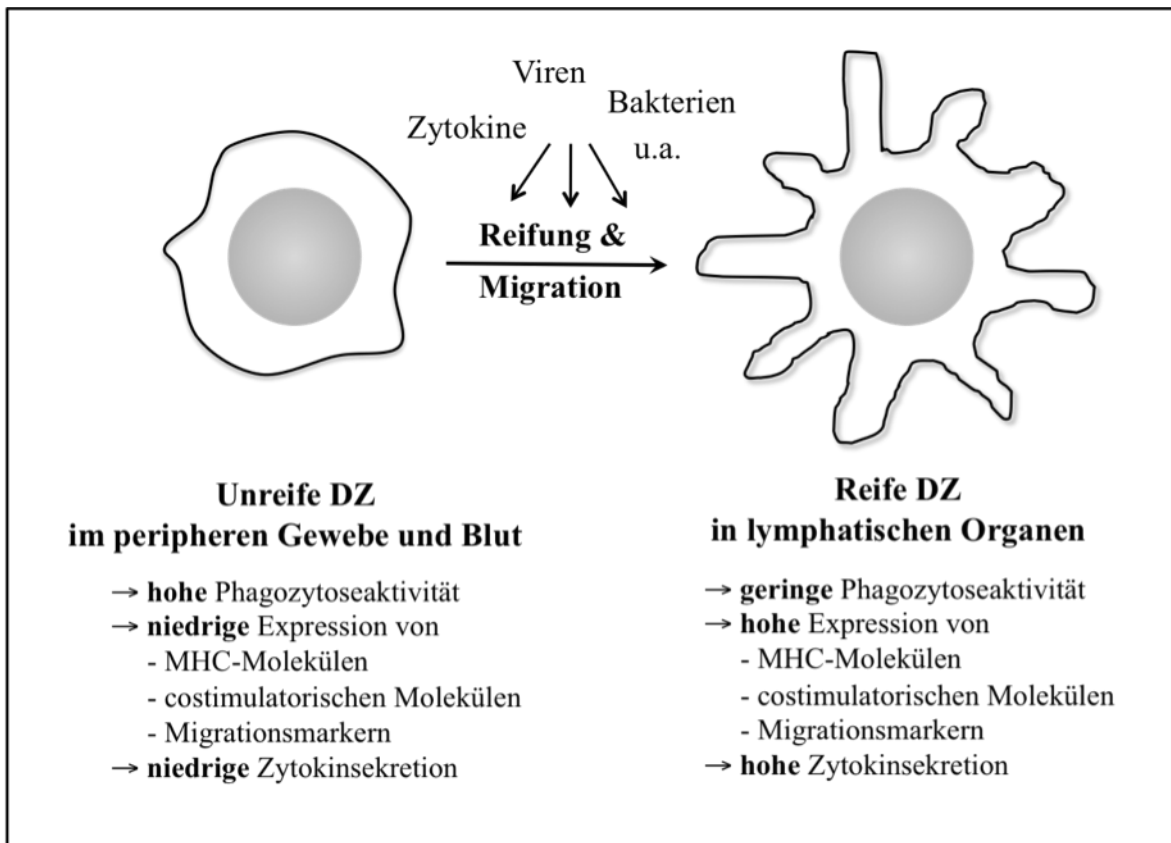


Abb. 4: Gegenüberstellung von immaturren und aktivierten DZ

## 1.7 Ziele dieser Arbeit

Bisher wurden unterschiedliche Auswirkungen des *P. aeruginosa* Quorum Sensing Moleküls 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf humane und murine Immunzellen gezeigt. Seine Effekte speziell auf Dendritische Zellen wurden jedoch kaum untersucht. Als professionelle antigenpräsentierende Zellen agieren diese als Mittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und nehmen somit eine Schlüsselstellung bei der Auslösung einer effizienten Immunantwort ein. Hartnäckige Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* bei Zystische Fibrose Patienten lassen vermuten, dass der Keim über Mechanismen verfügt - trotz primär intakter Immunabwehr und aggressiver antiobiotischer Therapie - die gegen ihn gerichtete Immunantwort zu inhibieren. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass *P. aeruginosa* sich seines Quorum Sensing Moleküls 3oxoC<sub>12</sub>-HSL bedient, um die Funktion Dendritischer Zellen zu beeinträchtigen und somit eine effiziente Immunabwehr zu unterdrücken.

## 2. Material

### 2.1 Geräte und Software

Durchflusszytometer <i>FACSCanto</i> mit <i>FACSDiva Software version 4.1.2</i> <i>Bio-Plex Manager Software 4.1</i> Brutschrank <i>HeraCell240</i> und <i>Haereus BDD 6200</i>	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland Bio-Rad, München, Deutschland Thermo Fischer Scientific, Hanau, Deutschland
Brutschrank <i>Innova 4200</i>	New Brunswick, Scientific, Edison, NJ, USA und Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
<i>Cellscreen</i> CO <sub>2</sub> -Inkubator <i>HERAcell 240</i> Evaporator Typ 2363-DA	Innovatis, Deutschland Heraeus Instruments, Deutschland Geb. Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Lichtmikroskop <i>Leica DM IL</i> <i>Luminex® 200<sup>TM</sup></i> Microplate Reader (Photometer) <i>GENios<sup>TM</sup></i> mit Software XFluor4, Version 4.51 Multi Plate Reader, <i>Mithras LB 940</i> PC	Leica Microsystems, Deutschland Invitrogen, Darmstadt, Deutschland Tecan, Schweiz  Berthold GmbH, Deutschland Fujitsu/Siemens Celsius W340 i945G
Pipettierhilfe <i>Easypet</i> Plattformschüttler <i>Rotamax 120</i> Stereomikroskop <i>Lumar.V12</i> Vortexer <i>Vortex-Genie 2</i> Zentrifuge <i>Centrifuge 5810 R</i> Zentrifuge <i>Rotanta 460 R</i>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Heidolph-Instruments, Deutschland Carl Zeiss AG, Deutschland Scientific Industries, NY, USA Eppendorf Hettich, Deutschland

## 2.2 Verbrauchsmaterial und Kulturgefäße

12-well Platten, <i>Nunclon<sup>TM</sup> Surface</i>	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
96-well Platte	TPP®, Schweiz
Deckel mit Septum Silikon/Teflonbeschichtet	Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Falcon Tube 15, 50 ml	BD Biosciences
Infusions-Set mit Flügelkanüle, steril	Intermedica, Deutschland
Pipette <i>Research</i> 2,5, 20, 100, 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 2-200, 20-300 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen <i>SafeSeal-Tips®</i> , 2,5- 1000 µl	Biozym, Hess. Oldendorf
Polypropylen Röhrchen 15, 50 ml	Greiner, Deutschland
<i>Rotilabo®</i> -Probenfläschchen 2 ml	Carl-Roth
Borsilikatglas, klar, flacher Boden	
Serologische Pipetten <i>Stripette®</i> , 2- 25 ml	Sigma-Aldrich, Deutschland
Spritzen, 50 ml	BD Biosciences
Zellkulturflasche, <i>Nunclon<sup>TM</sup></i> Oberfläche	Nunc

## 2.3 Lösungen und Reagenzien

Agar	Carl-Roth
Biocoll-Trennlösung mit <i>Ficoll® 400</i>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dichte 1,077 g/ml	
D-PBS <i>Dulbecco's</i> Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Calcium & Magnesium	GIBCO® Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich
EDTA 0.5 M, pH 8.0, <i>ultra PURE</i>	GIBCO <sup>TM</sup> Invitrogen
<i>GlutaMAX<sup>TM</sup></i> -I Supplement, 200mM mit L-Alanyl-L-Glutamin in 0,85% NaCl	GIBCO® Invitrogen
Heparin-Natrium Braun 25000 I.E./ 5ml	Braun, Melsungen, Deutschland
L-Glutamin	GIBCO® Invitrogen
Trypanblau 0,4%	GIBCO <sup>TM</sup> Invitrogen

## 2.4 Lösungen und Puffer für das Durchflusszytometer

*BD FACSTow™ Clean Solution* BD Biosciences

*BD FACSTow™ Sheath Fluid* BD Biosciences

*BD FACSTow™ Shutdown Solution* BD Biosciences

FACS-Puffer:

D-PBS mit 2% FCS

## 2.5 Antikörper

Spezifität	Markierung	Klon	Spezies	Isotyp	Verdünnung	Firma
<b>CD83</b>	FITC	HB15e	Maus	IgG <sub>1</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>CD86</b> (B70/B7-2)	FITC	2331 (FUN-1)	Maus	IgG <sub>1</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>CD80</b> (B7-1)	PE	L307.4	Maus	IgG <sub>1</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>CD1a</b>	PE	HI149	Maus	IgG <sub>1</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>CD14</b>	APC	M5E2	Maus	IgG <sub>2a</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>CD40</b>	APC	5C3	Maus	IgG <sub>1</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>CD3</b>	PerCP	SK7	Maus	IgG <sub>1</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>HLA-DR</b>	PerCP	L243	Maus	IgG <sub>2a</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>CD184</b> (CXCR4)	APC	12G5	Maus	IgG <sub>2a</sub> , κ	1:35	BD Biosciences
<b>CD197</b> (CCR7)	PE	3D12	Ratte	IgG <sub>2a</sub> , κ	1:35	BD Biosciences

## 2.6 Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie

Fluoreszenzfarbstoff	Laser ( $\lambda = \text{nm}$ )	Absorptions- maximum ( $\lambda = \text{nm}$ )	Emissions- maximum ( $\lambda = \text{nm}$ )
<b>FITC</b> Fluorescein-Isothiocyanat	Argon 488	495	519
<b>PE</b> Phycoerythrin	Argon 488	565	575
<b>APC</b> Allophycocyanin	Helium-Neon 633-635	650	660
<b>PerCP</b> Peridinin-Chlorophyll- Protein Complex	Argon 488	490	675

## 2.7 Kulturmedien

RPMI 1640 Medium (1x) mit stabilem Glutamin,  
2.0 g/l  $\text{NaHCO}_3$  Biochrom AG, Berlin, Deutschland

### DZ-Kulturmedium (Zellkulturmedium):

500 ml VLE-RPMI 1640 mit stabilem Glutamin,  
2,0 g/l  $\text{NaHCO}_3$ ,  
7,5 ml hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum

Biochrom AG

MP Biomedicals<sup>TM</sup>

### DZ-Nährmedium (mit Zytokinen):

500 ml VLE-RPMI 1640 mit stabilem Glutamin,  
2,0 g/l  $\text{NaHCO}_3$ ,  
7,5 ml hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum,  
IL-4 (20 ng/ml Endvolumen),  
GM-CSF (100 ng/ml Endvolumen)

Biochrom AG

MP Biomedicals<sup>TM</sup>  
CellGro, CellGenix GmbH,  
Freiburg Fa. Berlex, Großhadern

### Luria-Bertani- (LB-) Medium

(nach Bertani, G. 1951, modifiziert)  
10 g Caseinhydrolysat  
5 g Hefeextrakt  
4-5 g NaCl  
1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$   
pH 7.4

## 2.8 Seren

Fetales Kälberserum (engl.: fetal calf serum, FCS)

GIBCO® Invitrogen

Humanes AB Serum *CELLect*®, hitzeinaktiviert

MP Biomedicals<sup>TM</sup>, Eschwege,  
Deutschland

## 2.9 Stimulanzen

### 2.9.1 Zytokine

GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Sargramostatin*)

Fa. Berlex, Großhadern,  
Deutschland

rhuIL-4 (Recombinant human Interleukin 4)  
gelöst in D-PBS + 2% Humanes AB Serum

CellGenix, Freiburg, Deutschland

### 2.9.2 LPS

LPS (Lipopolysaccharid) (*E. coli* 0111:B4)

Sigma-Aldrich

### 2.9.3 Jonuleit Zytokin-Cocktail

rhuIL-1 $\beta$  (Recombinant human Interleukin 1 $\beta$ ),  
10 ng/ml, in D-PBS

PromoCell

rhuIL-6 (Recombinant Human Interleukin 6),  
15 ng/ml, in D-PBS + 0,1% Humanes AB Serum

R&D Systems GmbH, Wiesbaden-  
Nordenstadt, Deutschland

rhuTNF- $\alpha$  (Recombinant Human Tumor Necrosis  
Factor- $\alpha$ ) (*E.coli*), 10 ng/ml,

PromoCell GmbH, Heidelberg,  
Deutschland

in 100  $\mu$ l steriles H<sub>2</sub>O<sub>dem.</sub> + 900  $\mu$ l D-PBS

PGE<sub>2</sub> (Prostaglandine E2), 1000 ng/ml,  
in DMSO + RPMI-Medium

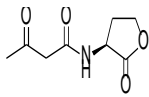
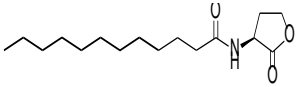
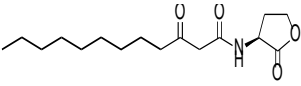
Cayman Chemicals, Ann Arbor,  
MI, USA

## 2.10 Mikroorganismen

*Pseudomonas putida* F117 Plasmid pKR-C12,  
GFP-markiert

Abteilung Mikroben-Pflanzen  
Interaktion, Helmholtz Zentrum,  
München

## 2.11 N-(Acyl)-L-Homoserinlactone (AHL)

AHL	Kurzform	Summenformel	Strukturformel
N-(3-Oxobutyl)-L-Homoserinlacton	3oxoC <sub>4</sub> -HSL	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	
N-(Dodecanoyl)-L-Homoserinlacton	C <sub>12</sub> -HSL	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	
N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserinlacton	3oxoC <sub>12</sub> -HSL	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub>	

Bei den in der Arbeit verwendeten AHL handelt es sich um synthetische AHL Moleküle, die von der University of Nottingham, School of Molecular Medical Sciences, Centre for Biomelucular Science, Nottingham England, bezogen wurden.

## 2.12 Kits

### Bio-Plex Human Cytokine Assay

Bio-Rad

9-plex 1x 96-well  
(IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TNF-alpha)

### Bio-Plex Cytokine Reagent-Kit

Bio-Rad

- Bio-Plex Assay-Puffer
  - Bio-Plex Wasch-Puffer
  - Detektions-AK-Diluent
  - Streptavidin-Phycoerythrin
- Sterile Filter-Platten (96-Well)

### Bio-Plex Cytokine Assay-Kit

Bio-Rad

- Anti-Zytokin konjugierte Beads
- Zytokin-Detektions-Antikörper
- Zytokin-Standards

### CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Promega, Madison, WI, USA



### 3. Methoden

#### 3.1 Herstellung und Aufbewahrung von AHL Aliquots

Lyophilisiertes AHL Pulver wurde in DMSO gelöst (Endkonzentration: 0,1 M) und als 10 µl Aliquots in Glasröhrchen abgefüllt. In gelöstem Zustand sind AHL sehr instabil und zerfallen innerhalb kurzer Zeit, daher wurde im Anschluss das Lösungsmittel im N<sub>2</sub>-Strom mithilfe eines Evaporators abgedampft. Die trockenen AHL Aliquots wurden bei -20°C gelagert und vor der Verwendung wieder in 15 µl DMSO gelöst. In dieser Form sind sie bei +4°C ohne messbaren Wirkungsverlust bis zu zwei Wochen haltbar.

#### 3.2 Messung der AHL Bioaktivität

Um die Bioaktivität der abgedampften, aliquotierten AHL zu überprüfen, wurden Biotests durchgeführt. Dazu wurde die AHL-negative Mutante von *Pseudomonas putida* IsoF, der Reporterstamm *P. putida* F117 (Steidle et al., 2002) eingesetzt. Dieser *Pseudomonas* Stamm verfügt über ein GFP-markiertes Sensorkonstrukt, welches spezifisch ist für AHL mit langen Seitenketten mit und ohne Oxo-Substitution (K Riedel et al., 2001). *P. putida* F117 selbst ist nicht in der Lage, AHL zu produzieren, verfügt jedoch über Rezeptoren für AHL. Über die Kopplung der AHL-Rezeptoren an das GFP-Sensorprodukt, kann man mit seiner Hilfe die Aktivität zugegebener AHL messen. Dazu wurde *P. putida* in LB-Medium unter Zugabe von Gentamycin über Nacht inkubiert und auf selektivem Festmedium ausplattiert. Die AHL wurden in 15 µl DMSO gelöst, davon 10 µl in Konzentrationen von 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml auf die *P. putida* Kulturplatte gegeben und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte für die Reifung des GFP-Proteins ein zweiter Inkubationsschritt über 24 h bei +4°C. Mithilfe eines Stereomikroskops wurde die GFP-Fluoreszenz der Keime bestimmt. Ein Fluoreszenz-Signal ist nur bei Anwesenheit intakter AHL detektierbar und kann daher als Indikator für deren Bioaktivität herangezogen werden.

### **3.3 Zellkultur**

Die Arbeit mit Zellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, stets unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank. Die Kultivierung und Inkubation der Zellen mit Stimulanzen fand im sterilen Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre statt. Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch im thermostatischen Wasserbad auf 37°C erwärmt.

#### **3.3.1 Generierung humaner Dendritischer Zellen**

##### **3.3.1.1 Isolation von PBMZ und Anreicherung von Monozyten**

Humane periphere mononukleäre Blutzellen wurden aus venösem Blut gesunder Nichtraucher gewonnen. Die Isolierung erfolgte mittels Plastikadhärenz (W. E. Bennett & Cohn, 1966), eine Methode, bei der man sich die Eigenschaft der Monozyten zu Nutze macht, an Plastikoberflächen zu adhären.

Dazu wurde gesunden Probanden 100 ml Blut aus einer Armvene in eine heparinisierte Spritze entnommen. Das Blut wurde in einer Zellkulturflasche mit 140 ml RPMI vermischt und auf sechs 50 ml-Falcon-Tubes zu jeweils 40 ml verteilt. Für eine erste Phasentrennung von Plasma und zellulären Bestandteilen wurden die Tubes 30 min. lang in einem Winkel von 45° schräg gestellt. Daraufhin wurden sie vorsichtig vertikalisiert und zentrifugiert (25 min., 100 rcf, Beschleunigungsverzögerung (BV): 3, Bremse: 1, Temp.: 22°C). Der Thrombozytenüberstand (ca. 20 ml) wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die PBMZ mittels Dichtezentrifugation über einem Biocoll-Trennlösungs-Gradienten isoliert. Hierfür wurde das thrombozytenarme Blutgemisch in einer zweiten Zellkulturflasche 1:1 mit warmem (37°C) D-PBS verdünnt (Gesamtvolumen 180 ml) und davon jeweils 30 ml über 12 ml Biocoll-Trennlösung geschichtet (insgesamt sechs Tubes). Nach der ersten Dichtegradientenzentrifugation (18 min., 740 rcf, BV: 2, Bremse: 0, Temp.: 22°C) wurde die Hälfte der oberen Plasma-PBS-Phase abgenommen und erneut zentrifugiert. Durch die Zentrifugation über Ficoll kommt es entsprechend der Dichte der Blutbestandteile zu folgender Phasentrennung (von oben nach unten): 1. Serum(klar, rötlich), 2. Interphase: gelblich trüber Ring aus Lymphozyten und Monozyten (PBMZ), 3. Ficoll (klar, weiß), 4. Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten (trüb, dunkel rot). Die Interphase aus jeweils zwei Tubes wurde in ein 50 ml-Falcon-Tube mit 20 ml D-PBS

gegeben und gewaschen (10 min., 360 rcf, BV: 9, Bremse: 9, Temp.: 22°C). Um toxische Effekte durch Ficoll-Verunreinigungen zu vermeiden, wurde beim Absaugen des PBMZ-Rings streng darauf geachtet, mit der Pipettenspitze nicht in die Ficoll-Phase geraten. Nach einem weiteren Waschgang zur Entfernung der restlichen Thrombozyten (15 min., 120 rcf, BV: 5, Bremse: 3, Temp.: 22°C) wurden die Zellen in 2 ml DZ-Kulturmedium aufgenommen, gezählt und entsprechend der Zellzahl mit Zellkulturmedium auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml verdünnt. Daraufhin erfolgte die Adhärenz in 12-well- Zellkulturplatten. Um den membranschädigenden, direkten Kontakt der Zellen mit der Plastikoberfläche zu umgehen, wurde pro Kavität 1 ml warmes RPMI vorgelegt und anschließend 1 ml der Zellsuspension zugegeben. Zur homogenen Verteilung der Zellen in den wells wurde die Platte händisch äquilibriert und im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach 30 min. wurde die Platte erneut äquilibriert und für weitere 30 min. in den Brutschrank gestellt. Mikroskopisch waren die Monozyten nun als adhärente Zellen von den übrigen, im Medium schwimmenden PBMZ abgrenzbar. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden in vier Waschschritten mit warmem RPMI entfernt. Die Monozyten wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und zur Regeneration über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### **3.3.1.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau gemischt (1:10 Verdünnung) und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran sind undurchlässig für Trypanblau; tote Zellen dagegen besitzen eine permeable Zellmembran, der Farbstoff gelangt ins Cytoplasma und färbt es blau. Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus der Multiplikation von gezählten Zellen, Kammerfaktor ( $10^4$ ) und Verdünnungsfaktor.

### **3.3.1.3 Generierung unreifer Dendritischer Zellen**

Die Monozyten wurden für fünf bis sieben Tage kultiviert und mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen Dendritischen Zellen differenziert.

An Tag 1 (erster Tag nach Isolation der Monozyten) wurden pro well 500 µl Nährmedium zugegeben und die Zellkulturplatte zur gleichmäßigen Umverteilung des Mediums

äquiliibriert. An Tag 3 oder 4 wurden pro well 500 µl abgenommen und durch 500 µl frisches Nährmedium ersetzt. Nach insgesamt fünf bis sieben Tagen Kultivation hatten die Zellen das Stadium unreifer Dendritischer Zellen erreicht. Lichtmikroskopisch erschienen sie als große Zellen mit unregelmäßigen Konturen, nur selten mit Ausbildung von Fortsätzen.

### **3.3.2 Stimulation unreifer Dendritischer Zellen mit AHL in Ab- und Anwesenheit von LPS bzw. JC**

Um den Effekt des *P. aeruginosa* Autoinducers 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf humane DZ zu untersuchen, wurden unreife DZ mit AHL in Ab- und Anwesenheit von Maturationsstimuli in Form von LPS oder Jonuleit Zytokin-Cocktail (JC) kultiviert. Als Referenz wurden zwei nicht-pseudomonische AHL verwendet: 3oxoC<sub>4</sub>-HSL diente als Kontrolle für die Oxo-Substitution und C<sub>12</sub>-HSL als Kontrolle für die Kettenlänge.

LPS ist Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien und führt als potentes Endotoxin TLR-4-vermittelt zur Aktivierung von DZ. Bei JC handelt es sich um einen Zytokincocktail, bestehend aus pro-inflammatorischen Zytokinen und einem Prostaglandin (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub>), mit deutlich höherem Maturationspotential als LPS. Seinen Namen hat der Cocktail von H. Jonuleit, der die Effekte dieser Zytokin- und Prostaglandinzusammensetzung auf die Reifung von DZ untersucht und beschrieben hat (Jonuleit et al., 1997).

Die Stimulation der unreifen DZ erfolgte am fünften bis siebten Kultivierungstag. Nachdem pro well 500 µl Überstand abgenommen worden waren, wurden die Zellen mit einem AHL allein und unter Zugabe von LPS (0,1 µg/ml) bzw. JC stimuliert. Die nur mit AHL-behandelten DZ dienten als Kontrollen, um einen isolierten Effekt der einzelnen AHL auf die DZ-Reifung auszuschließen. Die Stimulanzien wurden dafür in DZ-Nährmedium aufgenommen, auf die wells verteilt (500 µl pro well) und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Negativkontrolle enthielt reines DZ-Nährmedium. Als Positivkontrolle wurden diejenigen Zellen definiert, die nur mit LPS bzw. JC stimuliert wurden.

### 3.3.3 Ernte der reifen Dendritischen Zellen

Nach 24-stündiger Maturation wurden die DZ geerntet. Dazu mussten die adhärenenten Zellen vom Wellboden gelöst werden. Zu diesem Zweck wurde pro well 1 ml EDTA-Lösung zugegeben und für 15 min. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers vorsichtig von der Welloberfläche gelöst und in 50 ml Falcon Tubes übergeführt. Nach der anschließenden Zentrifugation (12 min., 360 rcf, BV: 9, Bremse: 9, Temp.: 22°C) wurden die Überstände abgenommen, in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C für die spätere Zytokinmessung aufbewahrt. Um die Zellausbeute zu optimieren, wurden die Wells mit D-PBS gespült und zu der zugehörigen Zellsuspension im Falcon Tube gegeben.

Tubes zentrifugiert (10 min., 360 rcf, BV: 9, Bremse: 9, Temp.: 22°C). Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, wobei die Überstände verworfen und die Zellpellets in jeweils 360 µl FACS-Puffer aufgenommen wurde. Für die weiteren Schritte wurde die Zellsuspension jedes Tubes auf drei FACS-Röhrchen zu je 120 µl verteilt.

## 3.4 Antikörper-Färbung

Die Analyse der Expression von Maturationsmarkern (CD83, CD80, CD86, CD40, CD1a, CD14, CD3, HLA-DR) und Migrationsmarkern (CD184 (CXCR4), CD197 (CCR7)) durch die stimulierten DZ erfolgte mithilfe der Durchflusszytometrie. Hierzu wurden die DZ mit spezifischen, primären, fluoreszenzmarkierten murinen Ig-Antikörpern gefärbt.

Es wurde eine 4-Farben-Färbung durchgeführt, das heißt pro FACS-Röhrchen wurde mit vier Antikörpern gefärbt. Da der Inhalt eines wells auf drei FACS-Röhrchen verteilt worden war, wurden die Zellen jedes wells bzw. jeder Stimulationsbedingung mit insgesamt zwölf Antikörpern gefärbt. Acht davon waren Antikörper gegen Maturations- bzw. Migrationsmarker, die restlichen vier waren Isotypkontrollen (Tabelle 1.1 und 1.2). Letztere dienten zur Bestimmung unspezifischer Färbung der Zellen durch unspezifische Antikörper gleichen Isotyps.

Die Färbung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll: Die Antikörper wurden in die entsprechenden Röhrchen zu den in FACS-Puffer gelösten Zellen gegeben und für 20-30 min. im Dunkeln bei +4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (10 min., 360 rcf, BV: 9, Bremse: 9, Temp.: 22°C). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und die Zellen in 400 µl FACS-Puffer

aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert. Da die Intensität der Antikörperfarben unter Lichteinfluss rasch abnimmt, wurden die noch ausstehenden Proben während der Messung in einer dunklen Schublade oder im Kühlschrank aufbewahrt.

<b>FACS-Röhrchen</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>APC</b>	<b>PerCP</b>
Nr. 1	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp
Nr. 2	CD86	CD80	CD14	HLA-DR
Nr. 3	CD83	CD1a	CD40	CD3

**Tabelle 1.1:** Antikörperansätze für die 4-Farben-Färbung der Maturationmarker

<b>FACS-Röhrchen</b>	<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>APC</b>	<b>PerCP</b>
Nr. 1	Isotyp	Isotyp	Isotyp	Isotyp
Nr. 2	CD86	CD80	CD184	HLA-DR
Nr. 3	CD83	CD197	CD40	CD3

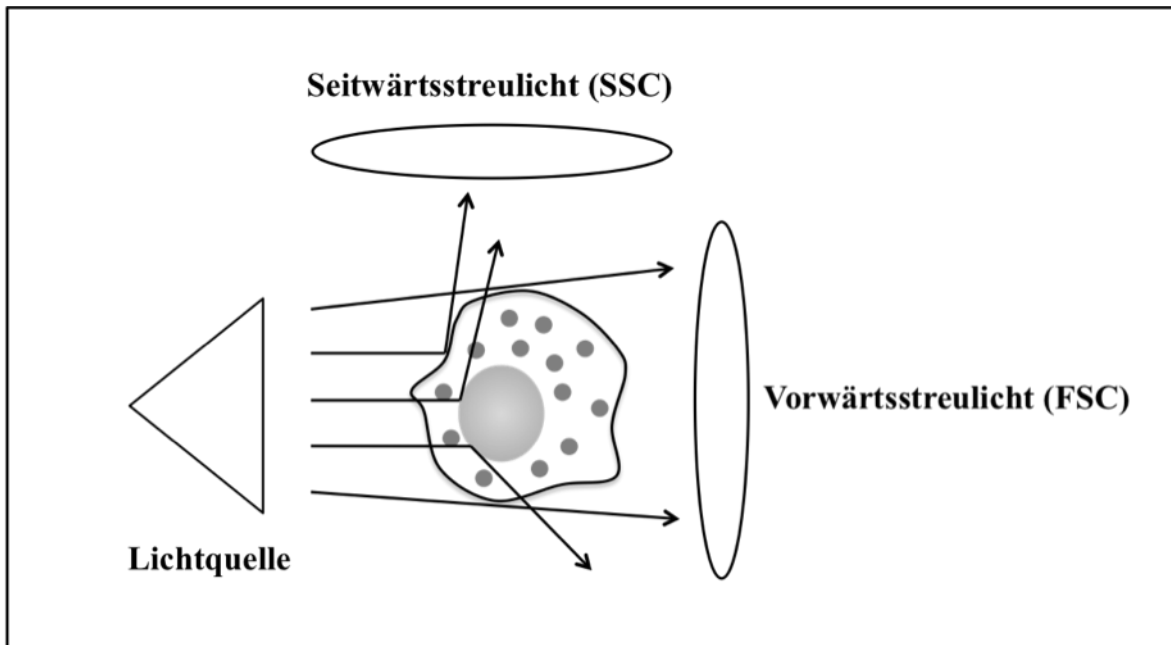
**Tabelle 1.2:** Antikörperansätze für die 4-Farben-Färbung der Maturations- und Migrationsmarker

## 3.5 Durchflusszytometrie

### 3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

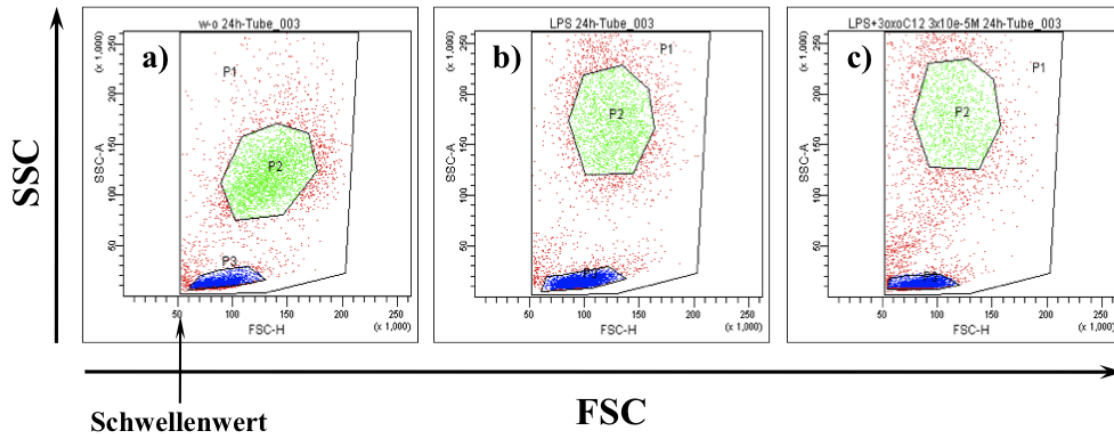
Mithilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Oberflächenstrukturen oder intrazelluläre Fragmente darzustellen und auf Einzelzellebene zu quantifizieren. Hierzu werden die zu analysierenden Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und in einem gerichteten, laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet. Die Flussrichtung der Zellen steht dabei senkrecht zum Lichtstrahl. Als Lichtquelle dient entweder ein roter Argon-Laser mit einer Wellenlänge  $\lambda = 488$  nm oder ein blauer Helium-Neon-Laser mit  $\lambda = 633$  nm. Trifft der Lichtstrahl am Messpunkt auf die Zellen, wird das auftreffende Licht von intra- und extrazellulären Partikeln gestreut. Das Ausmaß und die Richtung der Lichtstreuung werden bestimmt von Form, Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen sowie dem Vorhandensein von intrazellulären Granula. Zur Bündelung und Erfassung der abgelenkten Lichtstrahlen werden zwei Linsen

verwendet, eine davon parallel zum Laserstrahl (Vorwärtsstreulicht), die andere im rechten Winkel dazu (Seitwärtsstreulicht) (Abb. 4). Dabei ist das Vorwärtsstreulicht ein Maß für die Größe, das Seitwärtsstreulicht für die Granularität der Zellen.



**Abb. 5: Lichtstreuung bei der Durchflusszytometrie**

Die Darstellung der gemessenen Signale erfolgt in zweidimensionalen Diagrammen als sogenannte „Dot Plots“. Dabei entspricht jeder abgebildete Punkt einer Zelle bzw. einem Ereignis. Das Vorwärtsstreulicht wird auf der Abszisse (x-Achse), das Seitwärtsstreulicht auf der Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Je größer also eine Zelle ist, desto mehr lenkt sie das Vorwärtsstreulicht ab und desto weiter rechts im Graphen ist ihr Punktkorrelat zu finden. Zellen von hoher Granularität werden relativ weit oben im Diagramm abgebildet. Zellen einer Population mit ähnlichen morphologischen Eigenschaften bilden mehr oder weniger klar abgrenzbare „Punktwolken“. Auf diese Weise ist es möglich eine Zellpopulation durch die Ermittlung ihrer Morphologie näher einzugrenzen. Durch die Definition eines Schwellenwertes werden Zelldebris und andere kleine, nichtzelluläre Partikel von der Darstellung ausgeschlossen. Verändern sich die morphologischen Eigenschaften einer Zellpopulation, zum Beispiel im Rahmen der Reifung, so verschiebt sich die Wolke dementsprechend innerhalb des Diagramms (Abb. 5).



**Abb. 6: Punktwolkendarstellung von Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie**

Abszisse: Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC), Ordinate: (Seitwärtsstreulicht (Sidewartsscatter, SSC)

Zellpopulationen: P1: Alle Zellen, P2: Dendritische Zellen (DZ), P3: Lymphozyten

a) unstimulierte (immature) DZ (Negativkontrolle)

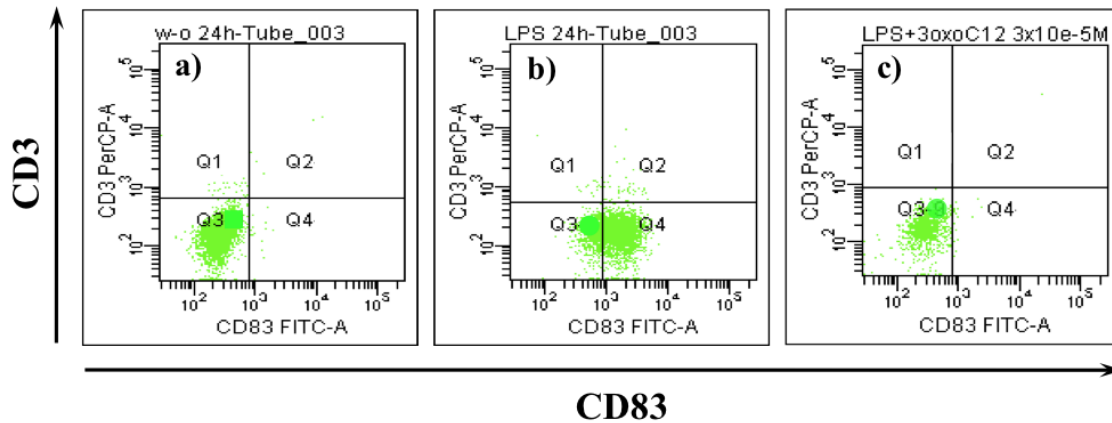
b) LPS-stimulierte DZ (Positivkontrolle)

c) LPS-stimulierte DZ nach Zugabe von 3oxoC<sub>12</sub>

Darüber hinaus regt das Laserlicht den Fluoreszenzfarbstoff der Antikörper, mit denen die Zellen markiert wurden, zur Emission einzelner Lichtquanten definierter Wellenlänge an. Die Lichtquanten werden durch eine Linse gesammelt, mittels spezieller Filter nach Wellenlängenspektren aufgetrennt und zu unterschiedlicher Detektoren gelenkt. Jeder Fluoreszenzfarbstoff erzeugt ein spezifisches Signal, daher ist die gleichzeitige Analyse mehrerer verschiedener Fluorochrome möglich, deren Signale aufgenommen und quantifiziert werden. Die Fluoreszenzintensität verhält sich direkt proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper pro Zelle, stellt also ein Maß dar für deren Dichte auf der Zelloberfläche.

Die Isotypkontrolle erlaubt die Entscheidung, ob die analysierte Zellpopulation für einen Marker positiv zu werten ist. Die Fluoreszenzintensität, die durch den Isotypantikörper erzeugt wird, wird als negativ definiert. Nur Signale, die höher ausfallen als die der Isotypen gelten als positiv. Dementsprechend kann man die Zellen „gaten“; darunter versteht man die Aufteilung des Diagramms in vier Quadranten. Auf diese Weise kann man Areale bestimmen, die Zellen als negativ oder positiv für einen Parameter definieren (Abb. 6).





**Abb. 7: Quadrantendarstellung der DZ-Population**

Abszisse: CD83 (FITC-Farbstoff), Ordinate: CD3 (PerCP-Farbstoff)

Q1: CD83<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>- Zellen, Q2: CD83<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>- Zellen, Q3: CD83<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>- Zellen, Q4: CD83<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>- Zellen

a) unstimulierte (unreife) DZ (Negativkontrolle)

b) LPS-stimulierte DZ (Positivkontrolle)

c) LPS- stimulierte DZ nach Zugabe von 3oxoC<sub>12</sub>

### 3.5.2 Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Maturations- und Migrationsmarker-Expression stimulierter DZ wurden die Zellen wie in 3.4 beschrieben mit den spezifischen Antikörpern und Isotypkontrollen gefärbt. Die Messung wurde mit dem Durchflusszytometer *FACSCanto* durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der *FACSDiva* Software Version 5.0.1.

Die Expression der einzelnen Oberflächenmarker wurde nach Kultivierung der DZ mit AHL mit und ohne Zugabe von LPS bzw. JC gemessen. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte, unreife DZ ohne AHL. Die Positivkontrolle bestand aus LPS- bzw. JC-stimulierten, reifen Zellen. Zur genauen Quantifizierung der Effekte der AHL auf die Reifung der DZ wurden zwei Größen gemessen. Zum einen wurde der prozentuale Anteil Oberflächenmarker-exprimierender Zellen bestimmt. Dieser Wert zeigt an, wie viele Zellen, gemessen an der Gesamtpopulation der DZ, den untersuchten Marker ausbilden. Zum anderen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt. Diese gibt Auskunft über die Anzahl von Markermolekülen auf der Oberfläche einer einzigen Zelle und erlaubt somit einen Rückschluss der Wirkung von AHL auf Einzelzelebene.

Tabelle 2 veranschaulicht das charakteristische Oberflächenmarker-Profil unreifer und reifer DZ.

Oberflächenmarker	Expression auf	
	unreifen DZ	reifen DZ
CD83	niedrig	hoch
CD80	moderat	hoch
CD86	moderat	hoch
CD40	hoch	hoch
HLA-DR	hoch	hoch
CD184 (CXCR4)	niedrig	hoch
CD197 (CCR7)	niedrig	hoch

**Tabelle 2:** Oberflächenmarker-Expressionsprofil unreifer und reifer DZ

### 3.6 Viabilitätstest

Es wurde ein Viabilitätstest durchgeführt, um toxische Effekte der AHL auf die DZ auszuschließen. Die Viabilität der Zellen wurde untersucht, indem deren Stoffwechselaktivität gemessen wurde. Der Test wurde mit dem *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay* durchgeführt. Lebende Zellen mit intaktem Stoffwechsel reduzieren den Indikatorstoff Resazurin zu Resorufin. Bereits tote oder apoptotische Zellen verlieren rasch ihre metabolische Aktivität und damit die Fähigkeit, den Indikatorstoff umzusetzen. Von der Menge des reduzierten Resazurins kann man auf die Zahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen schließen.

Resazurin ist ein dunkelblauer Farbstoff von geringer intrinsischer Fluoreszenz. Wird Resazurin zu Resorufin reduziert, kommt es zu einem Farbumschlag von blau zu pink. Resorufin ist stark fluoreszent und kann photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 573 nm gemessen werden.

Wie in 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, wurden aus peripheren Blutmonozyten DZ generiert und stimuliert. Nach 22 h Stimulationszeit wurden 300 µl *CellTiter-Blue®*-Reagenz pro well hinzugegeben, die Platte äquilibriert und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Die Evaluation der Zellviabilität erfolgte photometrisch mit dem *Multi plate reader Mithras LB 940* bei einer Wellenlänge von 573 nm.

### **3.7 Bestimmung der optimalen AHL Konzentration**

Da bei unterschiedlichen Konzentrationen von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL uneinheitliche Effekte auf die untersuchten Zellen beobachtet worden waren (vgl. Einleitung 1.3.2), wurden in einem Versuchsansatz die DZ mit vier verschiedenen 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-Konzentrationen (10 µM, 30 µM, 60 µM und 100 µM) behandelt, um eine Dosis zu ermitteln, die eine eindeutige Wirkung auf die DZ-Maturation zeigte. Toxizität der AHL wurde für jede Konzentration mit einem Viabilitätstest ausgeschlossen (3.3.6).

Dazu wurden aus peripheren Blutmonozyten DZ generiert (3.3.1) und mit LPS (0,1 µg/ml) und den unterschiedlichen AHL Konzentrationen kultiviert. Als Positivkontrolle dienten LPS-stimulierte DZ ohne Zugabe von AHL. DZ, die nur mit 3oxoC<sub>12</sub>-HSL bzw. dem Lösungsmittel DMSO (100 µM) inkubiert worden waren, wurden als Kontrollen mitgeführt. Der Einfluss der verschiedenen Konzentrationen von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf die Maturationsmarker-Expression der DZ wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen und mit der Positivkontrolle verglichen.

### 3.8 Zytokinquantifizierung mittels Bio-Plex

Das Zytokinsekretionsmuster ist neben der Expression von Oberflächenmolekülen ein weiterer entscheidender Indikator für den Stimulations- und Differenzierungsgrad von DZ. Zytokine sind Eiweißmoleküle, die von aktivierten DZ sezerniert werden und als interzelluläre Signalstoffe wirken. Neben anderen Faktoren bestimmen sie die Art der Immunantwort, da unterschiedliche Zytokine unterschiedliche T-Zelltypen zur Proliferation und Differenzierung veranlassen. Zur quantitativen Messung der Zytokinproduktion wurde der *Bio-Plex Human Cytokine Assay* verwendet.

Der *Bio-Plex Cytokine Assay* funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, engl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Gegenüber einfachen Immunadsorptionstests bietet er den Vorzug, dass man mehrere Zytokine gleichzeitig messen kann. Spezifische Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin sind kovalent an farbkodierte Polystyrol-Beads gebunden. Die Bead-gekoppelten Antikörper reagieren mit den Zytokinmolekülen im Kulturüberstand, der bei der DZ-Kultivierung gewonnen wurde (3.3.3).

Insgesamt wurden neun Zytokine bestimmt: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ . Ungebundenes Protein wurde durch mehrere Waschgänge entfernt und ein weiterer, biotinylierter Antikörper, spezifisch für ein anderes Epitop auf den Zytokinen, zugegeben. Somit bildet sich ein Antikörperkranz um die einzelnen Zytokine. Die Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin ermöglicht die Detektion einer Antikörper-Zytokin-Einheit. Die in Assay-Puffer gelösten Zytokin-Antikörper-Komplexe werden durch eine Nadel in das Detektionssystem gesogen. Bei dem Detektionssystem handelt es sich um ein Durchflusszytometer mit zwei Lasersystemen, in dem jede einzelne Zytokin-Antikörper-Reaktion nach Bead-Farbe und Fluoreszenz identifiziert und quantifiziert wird. Die Zahl der gebundenen biotinylierten Antikörper erlaubt die Quantifizierung, und die spezifischen Bead-Farben die Charakterisierung der einzelnen Zytokine.

Die Wells der 96-Well-Filterplatte wurden jeweils mit 100  $\mu$ l Assay-Puffer befeuchtet. Der Puffer wurde mittels Vakuumpumpe abgesaugt und pro Well 50  $\mu$ l verdünnte, Bead-Flüssigkeit pipettiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und die Platte zweimal mit 100  $\mu$ l Wasch-Puffer pro Well gewaschen. Anschließend wurden 50  $\mu$ l der jeweiligen Standard-

Verdünnung bzw. der Proben in die entsprechenden Wells gegeben, die Platte mit Plastik- und Alufolie abgedeckt und für 30 min. auf den Rüttler gestellt (300 rpm). Hiernach wurde die Folie vorsichtig von der Filterplatte entfernt, die Flüssigkeit abgesaugt und die wells dreimal mit 100 µl Wasch-Puffer gewaschen. Pro well wurden 25 µl Detektions-Antikörper-Verdünnung pipettiert, die Platte wieder mit Folien abgedeckt und zur Inkubation auf den Rüttler gestellt (30 min., 300 rpm). Wie im vorherigen Schritt wurde die Flüssigkeit abgesaugt, pro well dreimal mit 100 µl Wasch-Puffer gewaschen und 50 µl der Streptavidin-Verdünnung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min. auf dem Schüttler (300 rpm) und drei Waschschritten mit 100 µl Wasch-Puffer, wurden die Beads in 125 µl Assay-Puffer resuspendiert. Die Filterplatte wurde mit Plastik- und Alufolie bedeckt und bis zur Messung auf den Schüttler gestellt (300 rpm), um eine homogene Verteilung der Antikörper-Bead-Zytokin-Komplexe im well zu gewährleisten. Die Messung wurde am Luminex-Gerät *Luminex® 200<sup>TM</sup>* in zwei Kalibrierungseinstellungen durchgeführt, „high“ und „low“. Die „high“-Einstellung erlaubt eine genauere Messung im hochverdünnten Bereich, also für Proben mit niedriger Zytokinkonzentration. Die „low“-Einstellung dient der Messung gering verdünnter Proben, d.h. in Bereichen mit höherer Konzentration. Alle Proben wurden mit beiden Kalibrierungseinstellungen gemessen und die geeignete Einstellung nachträglich bei der Auswertung ermittelt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Bio-Plex-Manager Software Version 4.1.

Die Standardkurven wurden für jedes Zytokin einzeln überprüft und ggf. angepasst, indem Ausreißer entfernt wurden. Als Positivkontrolle diente der Überstand LPS- bzw. JC-stimulierter DZ. Die Zytokinmenge in den gemessenen Proben wurde in Relation zu dieser gesetzt.

### 3.9 Auswertung und Statistik

Für die Analyse und graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Auswertungsprogramm *GraphPad Prism* verwendet. Statistisch wurden die Daten mit one-way analysis of variance (one-way ANOVA) ausgewertet, ein Test der die Mittelwerte von zwei oder mehr Gruppen miteinander vergleicht. Der one-way ANOVA testet die Nullhypothese, dass sich die Werte von zwei oder mehr Versuchsgruppen *nicht* unterscheiden. Der Test zeigt an, *ob* sich die Mittelwerte der verglichenen Gruppen signifikant unterscheiden. Um zu überprüfen, *welche* Mittelwerte statistisch signifikante Unterschiede aufweisen, wurde anschließend der post-hoc multiple comparison test nach

Bonferroni-Dunn durchgeführt. Bei diesem Test handelt es sich um einen eher konservativen post-hoc Test, der sicherstellt, dass das ursprüngliche Signifikanzniveau erhalten bleibt, und dass im Zuge des multiplen Testens das Ergebnis nicht an Signifikanz verliert.

Innerhalb eines Versuchsansatzes wurde zunächst von jedem Ergebniswert der Wert der Negativkontrolle (unbehandelte Zellen) abgezogen. Anschließend wurde der Wert jedes Behandlungsschemas (DZ stimuliert mit LPS + 3oxoC<sub>4</sub>-HSL, LPS + C<sub>12</sub>-HSL, LPS + 3oxoC<sub>12</sub>-HSL) auf den Wert der Positivkontrolle (LPS-stimulierte DZ) normiert. Aus den so normierten Werten wurde dann für jedes Behandlungsschema der Mittelwert aus allen Versuchen berechnet. In der graphischen Darstellung der Ergebnisse finden sich daher prozentuale Angaben der Ergebnisse relativ zu LPS-stimulierten DZ (Positivkontrolle, 100%).

Signifikanzen sind mit verbindenden Balken zwischen den betreffenden Werten und Sternchen gekennzeichnet. Ein Sternchen (\*) zeigt einen Signifikanzwert  $p = 0,05$ , zwei Sternchen (\*\*) entsprechen einem  $p = 0,01$ .

## **4. Ergebnisse**

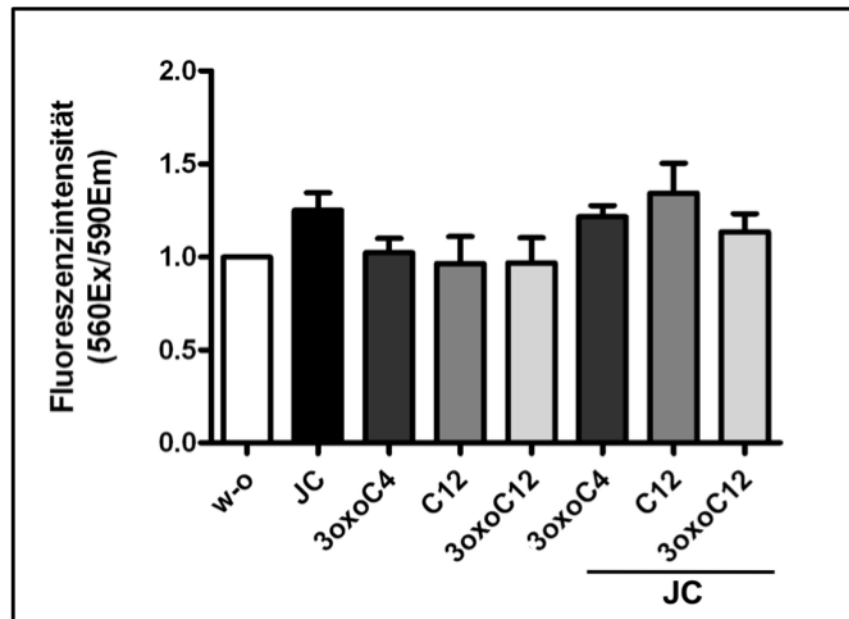
### **4.1 Bestimmung der Bioaktivität der AHL**

Die Bioaktivität der getrockneten AHL Aliquots wurde mithilfe eines Biotests mit dem AHL-Rezeptorstamm *Pseudomonas putida* F117 pKR-C12 getestet (3.2). Der Test wurde mit den drei in dieser Arbeit verwendeten AHL-Typen durchgeführt (3oxoC<sub>4</sub>-HSL, C<sub>12</sub>-HSL, 3oxoC<sub>12</sub>-HSL). In den drei getesteten Konzentrationen (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) kam es stereomikroskopisch zur GFP-Fluoreszenz. Daraus konnte auf die Intaktheit und Aktivität der aliquotierten AHL geschlossen werden.

### **4.2 Viabilitätstest AHL-stimulierter Dendritischer Zellen**

Eine toxische Wirkung der AHL auf die DZ wurde ausgeschlossen, indem deren Stoffwechselvermögen nach Kultivierung mit den drei AHL in einer Konzentration von 60 µM mit und ohne Zugabe von JC untersucht worden war. Dabei wurde die Negativkontrolle (unbehandelte DZ) mit 100% Zellviabilität als Bezugsgröße für die anderen Proben definiert. Als statistisches Verfahren wurde der Dunn's Multiple Comparison Test verwendet.

Verglichen mit der Negativkontrolle zeigten alle Proben keine verminderte bzw. sogar eine erhöhte Stoffwechselaktivität und damit eine unverminderte Vitalität der Zellen.



**Abb. 8:** Viabilitätsmessung der DZ nach Kultivierung mit AHL (60  $\mu$ M) mit und ohne Zugabe von JC. Fluoreszenzintensität relativ zur Negativkontrolle (w-o = 100%). Dunn's Multiple Comparison Test. Arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (Fehlerbalken). (n = 3)

### 4.3 Bestimmung der optimalen AHL Konzentration

Um eine 3oxoC<sub>12</sub>-HSL Konzentration mit quantifizierbarem Effekt auf LPS-stimulierte DZ zu ermitteln, wurden DZ mit LPS (0,1  $\mu$ g/ml) und vier verschiedenen Konzentrationen von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL kultiviert. Alle Werte wurden in Relation zu LPS-maturierten DZ (Positivkontrolle, 100%) dargestellt.

3oxoC<sub>12</sub>-HSL allein führte bei nicht-maturierten DZ zur Induktion der CD86-Expression um fast 75%, hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression von CD80, CD83 und CD40. Das Lösungsmittel DMSO zeigte keinerlei Wirkung auf die DZ (Daten sind in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt). In niedrigen Dosierungen (10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M) ließ sich, verglichen mit der Positivkontrolle, kein Effekt von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf den Maturationsgrad LPS-gereifter DZ beobachten. In einer Konzentration von 60  $\mu$ M, und noch deutlicher von 100  $\mu$ M, wirkte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL inhibitorisch auf die Expression der Oberflächenmarker LPS-stimulierter DZ. Im Folgenden wurden die AHL in einer Dosierung von 60  $\mu$ M eingesetzt, da für diese Konzentration toxische Effekte mittels eines Viabilitätstests eindeutig ausgeschlossen werden konnten (4.2). Bei höheren Konzentrationen zeigten Vorversuche vermehrten Zelluntergang (Daten sind in dieser Arbeit nicht gezeigt).



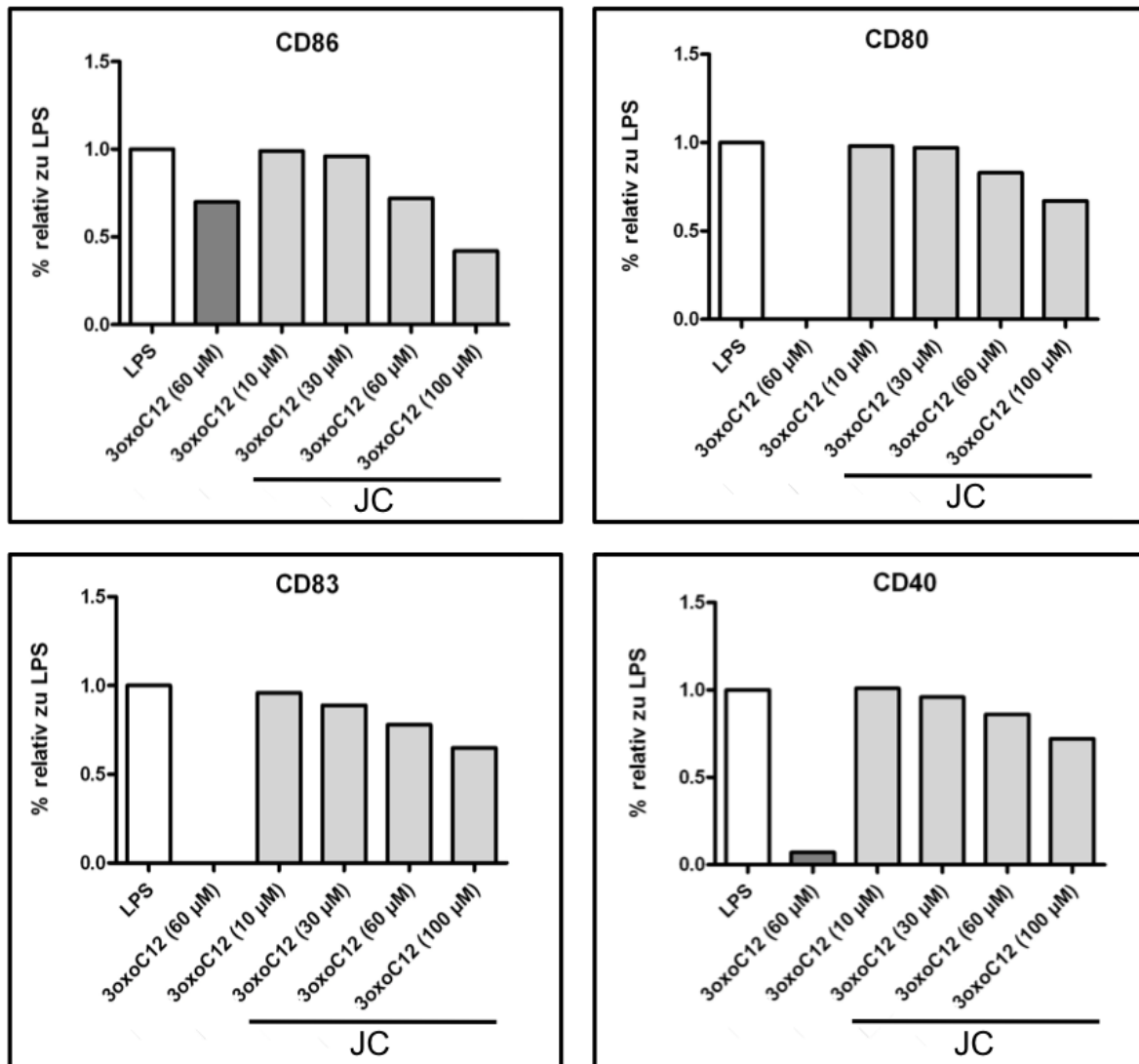


Abb. 9: Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83 und CD40 durch DZ nach Stimulation mit LPS (0,1 µg/ml) und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in den Konzentrationen 10 µM, 30 µM, 60 µM und 100 µM. Alle Werte sind relativ zu LPS (100%). (n = 1)

#### 4.4 Maturation Dendritischer Zellen mit AHL und LPS

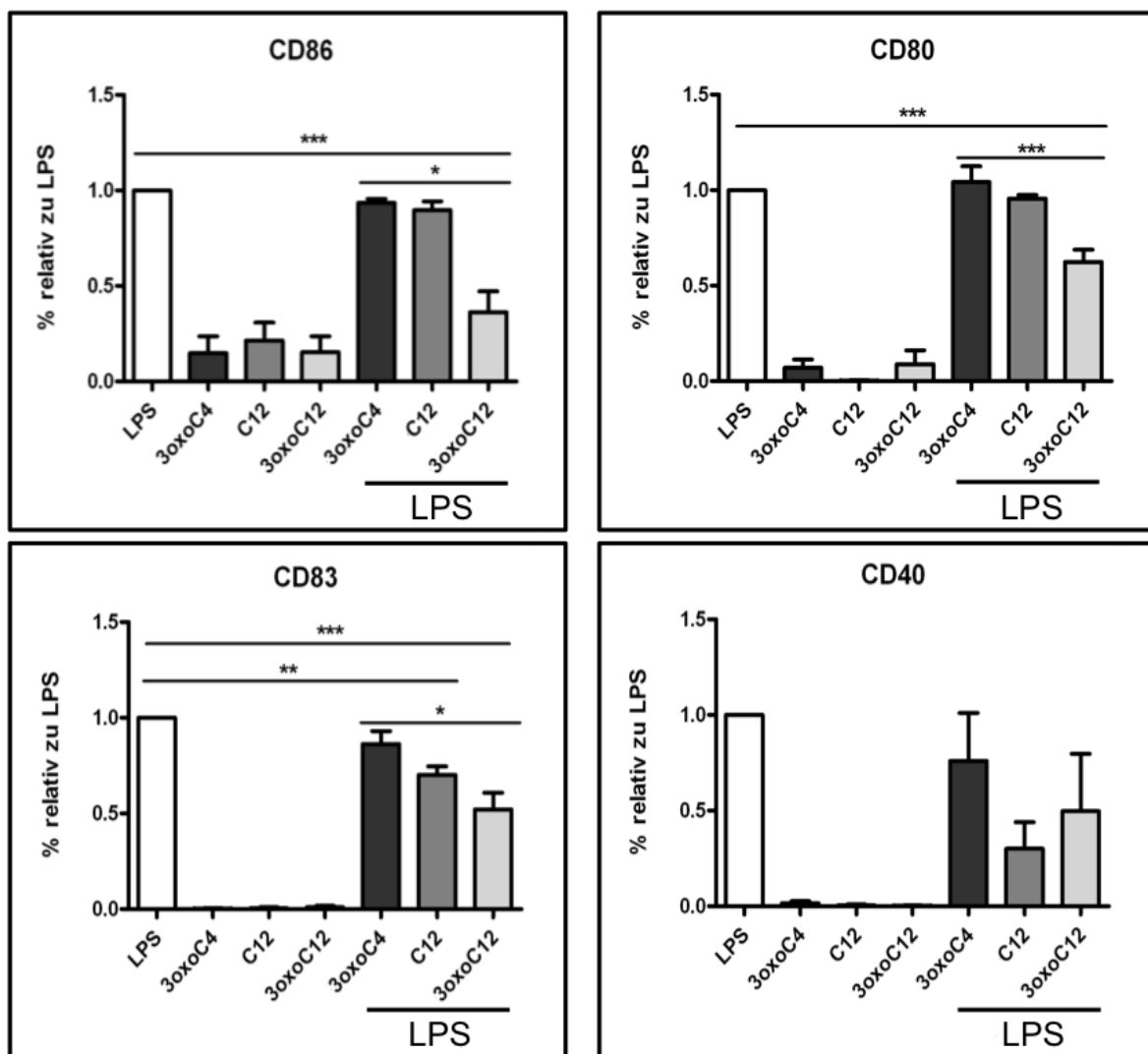
##### 4.4.1 Prozentualer Anteil reifer Dendritischer Zellen

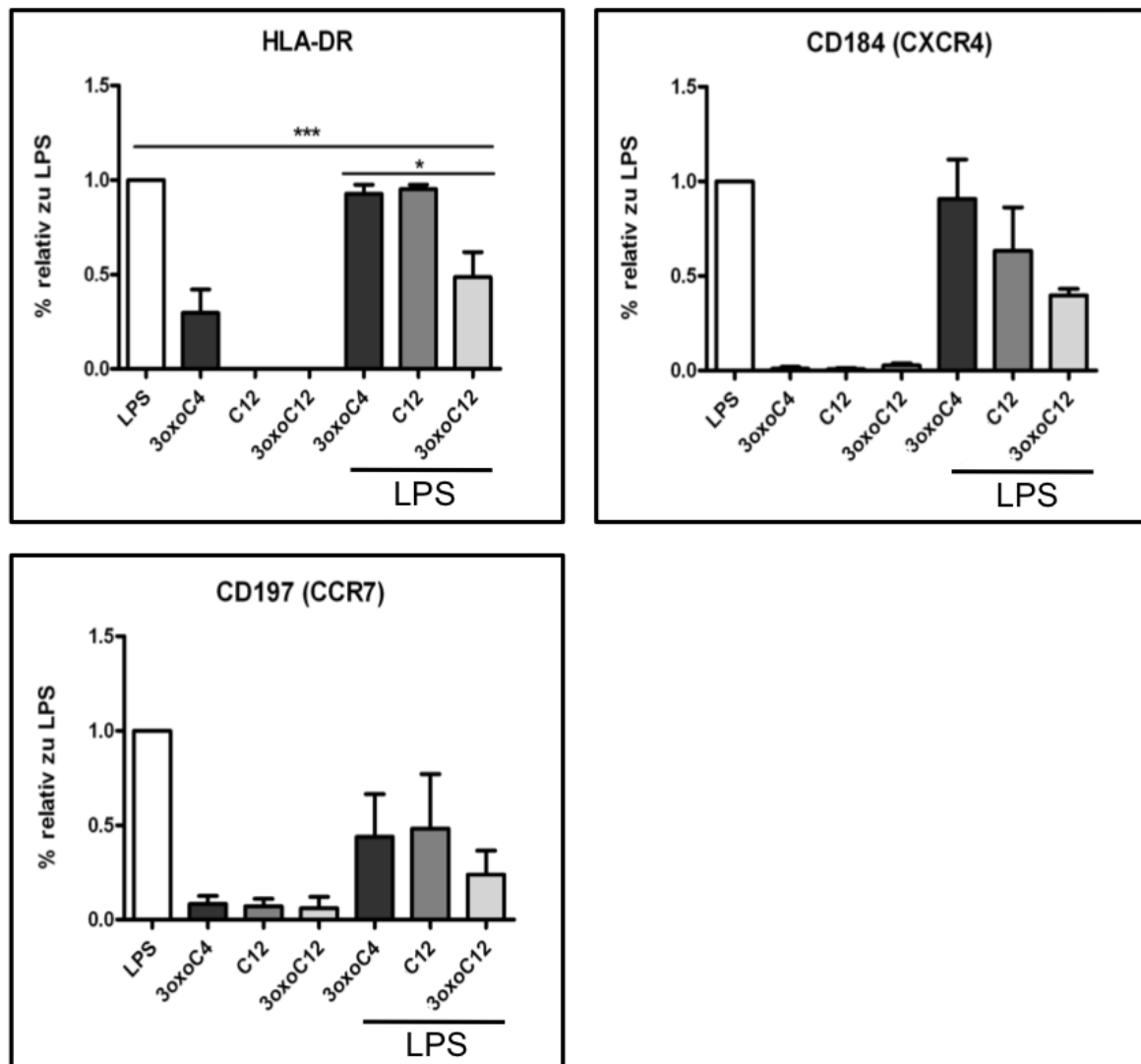
DZ, die mit LPS und 3oxoC<sub>4</sub>-HSL kultiviert wurden, zeigten eine ähnliche Expression der Oberflächenmoleküle wie die Positivkontrolle (75-100%). Nur für den Migrationsmarker CD197 zeigte sich eine Herabregulierung des Rezeptors um 56%.

Nach Kultivierung der Zellen mit LPS und C<sub>12</sub>-HSL ließ sich insgesamt eine verminderte Expression der Oberflächenmarker beobachten. Zu einer statistisch signifikanten Abnahme um 30% kam es bei CD83<sup>+</sup> Zellen. Nur 30% der so stimulierten Zellen waren positiv für

CD40. Der Anteil für CD184 positiver DZ lag bei 63%, für CD197 bei 48% verglichen mit LPS-gereiften DZ (100%). Auf die Expression der übrigen Marker (CD86, CD80 und HLA-DR) hatte C<sub>12</sub>-HSL nur wenig Auswirkung.

Die Coinkubation mit LPS und **3oxoC<sub>12</sub>-HSL** bewirkte eine deutliche Hemmung der DZ-Maturation. Signifikant erniedrigt waren CD86, CD80, CD83 und HLA-DR mit einem Signifikanzwert von  $p < 0,001$ . Verglichen mit LPS-3oxoC<sub>4</sub>-HSL-stimulierten DZ zeigten LPS-3oxoC<sub>12</sub>-HSL-aktivierte DZ ebenfalls eine signifikant niedrigere Expression von CD86, CD83 und HLA-DR (jeweils  $p < 0,05$ ) sowie von CD80 ( $p < 0,001$ ). Der Anteil von CD40<sup>+</sup> Zellen in diesem Ansatz war 50% , die Expression der Migrationsmarker lag bei lediglich 37% für CD184 und 24% für CD197 jeweils bezogen auf die Positivkontrolle.





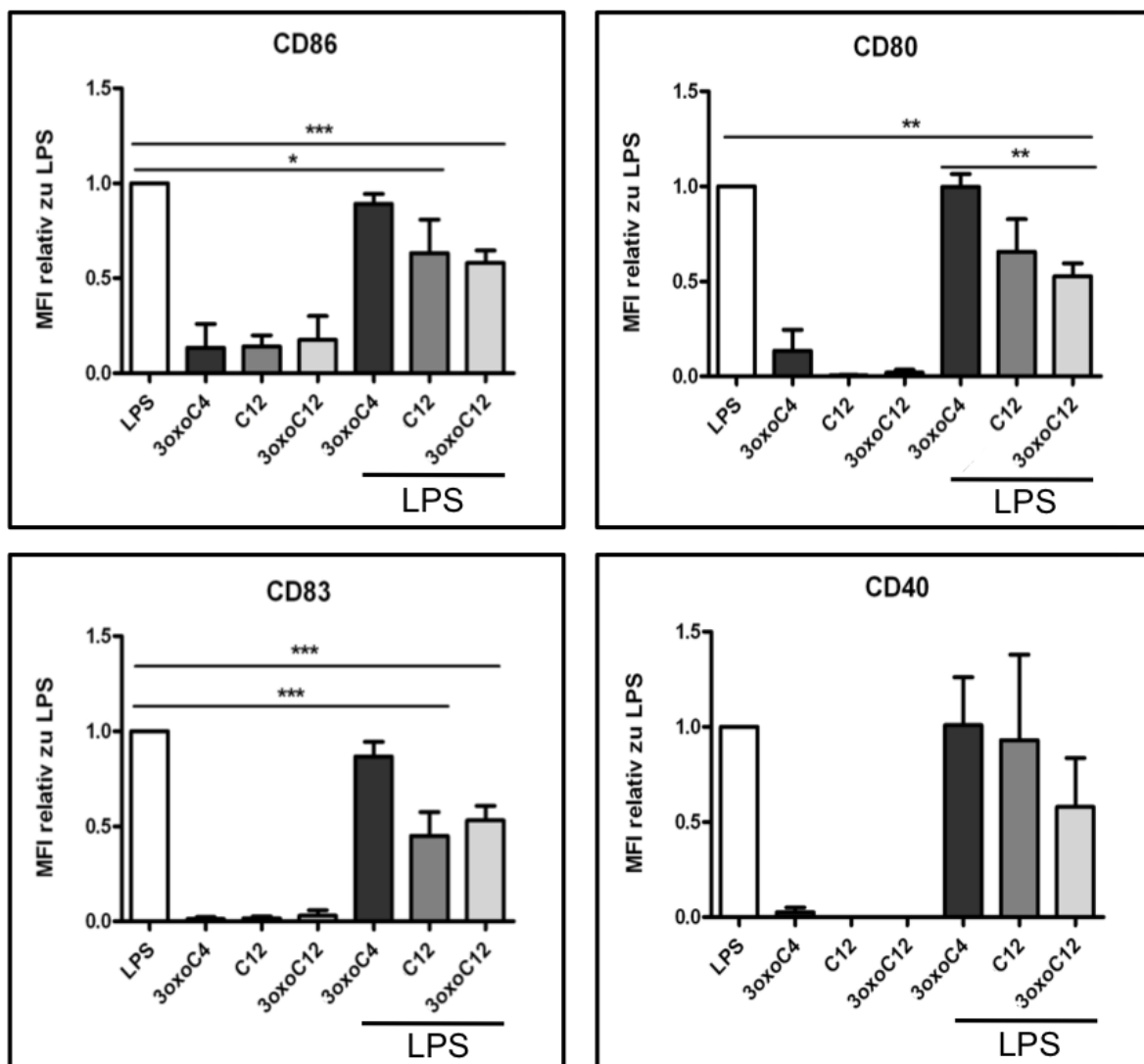
**Abb. 10:** Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR und Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60  $\mu$ M) mit und ohne LPS (0,1  $\mu$ g/ml). Alle Werte sind relativ zu LPS (100%). Dunn's Multiple Comparison Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ . Arithmetisches Mittel mit Standardfehler (Fehlerbalken). (CD86/CD80/CD83:  $n = 9$ , CD40:  $n = 4$ , HLA-DR:  $n = 7$ , CD184/CD197:  $n = 3$ ; für C12-HSL und LPS+C12-HSL:  $n = 3$ )

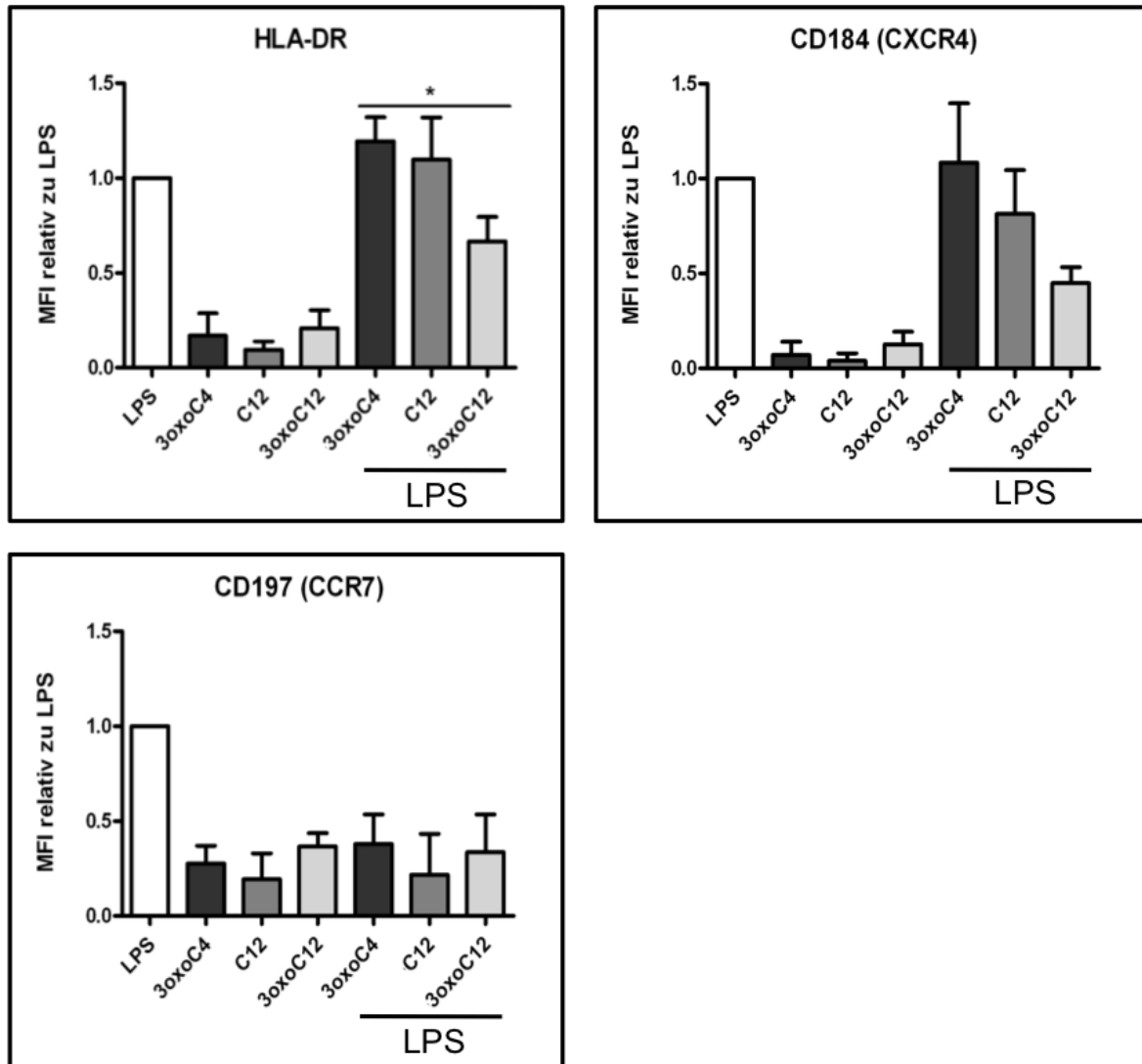
#### 4.4.2 Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) reifer Dendritischer Zellen

Die simultane Behandlung mit LPS und **3oxoC4-HSL** zeigte bis auf den Migrationsmarker CD197 mit nur 38% positiven Zellen keine hemmende Wirkung auf die Reifung der DZ. Im Falle von HLA-DR und CD184 konnte sogar eine erhöhte Markerichte von 119% bzw. 108% beobachtet werden.

Die Expressionsdichte aller Oberflächenmarker (ausgenommen HLA-DR) war bei LPS-**C<sub>12</sub>-HSL**-stimulierten DZ gegenüber der Positivkontrolle herabgesetzt. Signifikant gesenkt war die Dichte von CD86- ( $p < 0,05$ ) und CD83- ( $p < 0,001$ ) Molekülen.

Den größten Effekt hatte **3oxoC<sub>12</sub>-HSL** auf die Zahl der Maturationsmarker auf LPS-maturierten DZ mit Signifikanzen für CD86 und CD83 ( $p < 0,001$ ) und CD80 ( $p < 0,01$ ). Die Dichte von CD40 war auf 58%, die von HLA-DR auf 67% reduziert gegenüber LPS-stimulierten DZ. Die Migrationsmarker-Expression war gegenüber der Positivkontrolle für CD184 um 55% und für CD197 um 66% vermindert.





**Abb. 11:** Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR und Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60  $\mu$ M) mit und ohne LPS (0,1  $\mu$ g/ml). Alle Werte sind relativ zu LPS (100%). Dunn's Multiple Comparison Test, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,001$ . Arithmetisches Mittel mit Standardfehler (Fehlerbalken). (CD86/CD80/CD83:  $n = 9$ , CD40:  $n = 4$ , HLA-DR:  $n = 7$ , CD184/CD197:  $n = 3$ ; für C12-HSL und LPS+C12-HSL:  $n = 3$ )

#### 4.4.3 Vergleich der beiden Messgrößen (Prozentualer Anteil und MFI)

Vergleicht man den Prozentsatz der für einen Marker positiven DZ (Anzahl der Marker-exprimierenden Zellen relativ zur Gesamtpopulation der DZ) mit der Mittleren Fluoreszenzintensität Oberflächenmarker-exprimierender DZ in Relation zu der jeweiligen Positivkontrolle, ergeben sich zum Teil auffällige Unterschiede.

Während die Anzahl HLA-DR<sup>+</sup> Zellen unter LPS-3oxoC4-HSL-Stimulation auf 93% geringfügig erniedrigt war, fand sich auf Einzelzellebene eine erhöhte Zahl an HLA-DR-

Molekülen (MFI =119%). Ähnlich verhielt es sich mit dem Migrationsmarker CD184, dessen prozentualer Anteil bei 91%, die MFI hingegen bei 108% lag. Der prozentuale Anteil und die MFI der übrigen Marker unterschieden sich nicht wesentlich.

Der Prozentsatz HLA-DR<sup>+</sup> Zellen betrug bei LPS-**C<sub>12</sub>-HSL**-Inkubation 95%, wohingegen die MFI für HLA-DR 110% betrug. Mit Ausnahme von CD40 hatte C<sub>12</sub>-HSL auf die übrigen Maturationsmarker (CD86, CD80, CD83) und CD197 mit MFI-Werten zwischen 22% und 66% einen merklich inhibierenden Einfluss auf Einzelzellebene. In Bezug auf die Gesamtheit der stimulierten DZ (prozentualer Anteil) lag die Markerexpression höher (48 % bis 95%). Die Anzahl der CD40-Moleküle pro Zelle (MFI) war mit 93% nur wenig niedriger als die der Positivkontrolle, insgesamt fanden sich aber nur 30% CD40<sup>+</sup> DZ. Es fand sich ein erniedrigter Prozentsatz von CD184<sup>+</sup> Zellen (63%), mit einer MFI von 81%.

Bei LPS-**3oxoC<sub>12</sub>-HSL**-stimulierten Zellen war der prozentuale Anteil der CD86<sup>+</sup> (36%), HLA-DR<sup>+</sup> (49%) und CD197<sup>+</sup> (24%) Zellen um mindestens zehn Prozentpunkte niedriger als die MFI (CD86: 58%, HLA-DR: 67%, CD197: 34%) bezogen auf die jeweilige Positivkontrolle. Bei CD80 verhielt es sich umgekehrt, hier fand sich eine gegenüber dem prozentualen Anteil von 62% eine niedrigere MFI (53%).

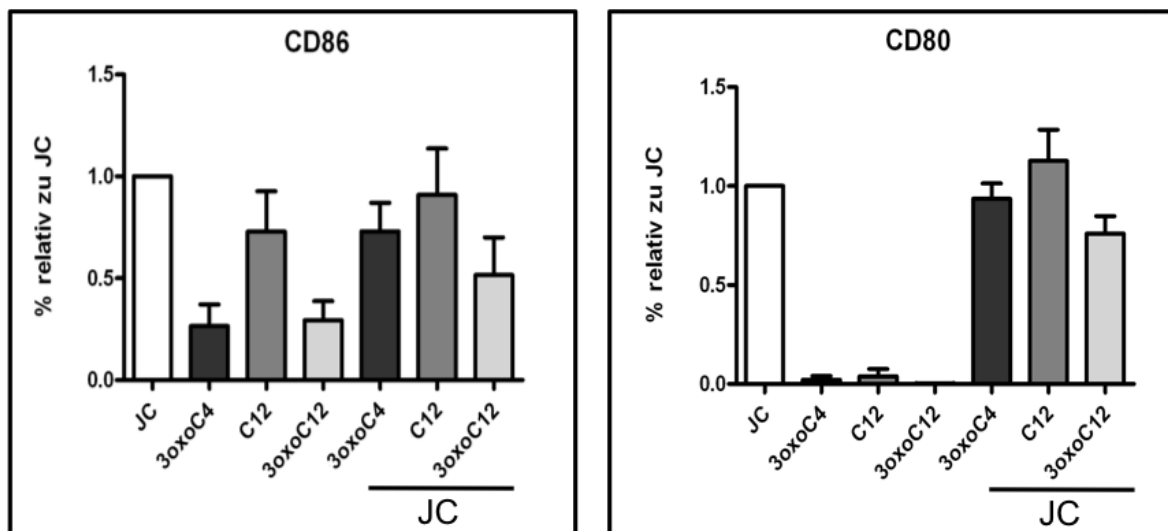
## 4.5 Maturation Dendritischer Zellen mit AHL und JC

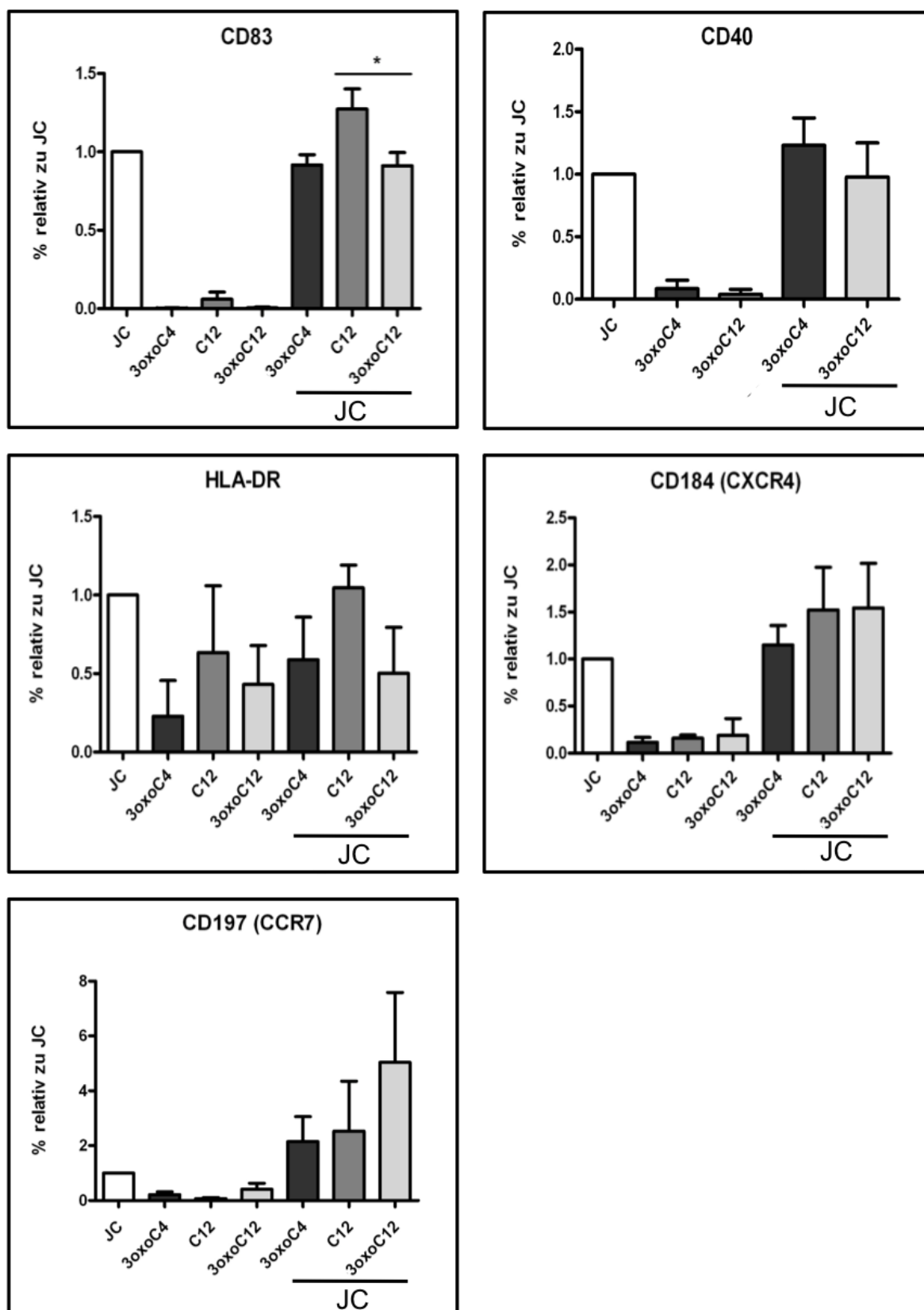
### 4.5.1 Prozentualer Anteil reifer Dendritischer Zellen

Zellen, die mit JC und **3oxoC<sub>4</sub>-HSL** kultiviert worden waren, zeigten eine nur gering erniedrigte Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83 und HLA-DR. Die Zahl der CD40<sup>+</sup> DZ war gegenüber LPS-maturierten DZ mit 123% erhöht. Auch der prozentuale Anteil der Migrationsmarker-tragenden Zellen überstieg die Positivkontrolle um 12% für CD184 und 115% für CD197.

Die Stimulation mit LPS und **C<sub>12</sub>-HSL** schien die Expression aller Reifungsmarker mit Ausnahme von CD86 zu induzieren. CD40 wurde aus technischen Gründen von der Messung ausgenommen.

**3oxoC<sub>12</sub>-HSL** zeigte durchgehend eine, wenn auch geringe, inhibierende Wirkung auf die Ausbildung von Maturationsmarkern auf LPS-stimulierten DZ. Die CD83-Expression dieser Zellen war im Vergleich zu JC-C<sub>12</sub>-HSL-gereiften Zellen signifikant geringer ( $p < 0,05$ ). Die Expression von Migrationsmarkern war unter diesen Bedingungen dagegen stark erhöht: Bezogen auf die Positivkontrolle waren 144% CD184<sup>+</sup>, CD197 war um das Fünffache erhöht (504%).





**Abb. 12:** Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR und Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60 µM) mit und ohne JC. Alle Werte sind relativ zu JC (100%). Dunn's Multiple Comparison Test, \* =  $p < 0,05$ . Arithmetisches Mittel mit Standardfehler (Fehlerbalken). (CD86/CD80/CD83:  $n = 7$ , CD40:  $n = 3$ , HLA-DR/CD184/CD197:  $n = 4$ ; für C12-HSL und LPS+C12-HSL:  $n = 3$ )

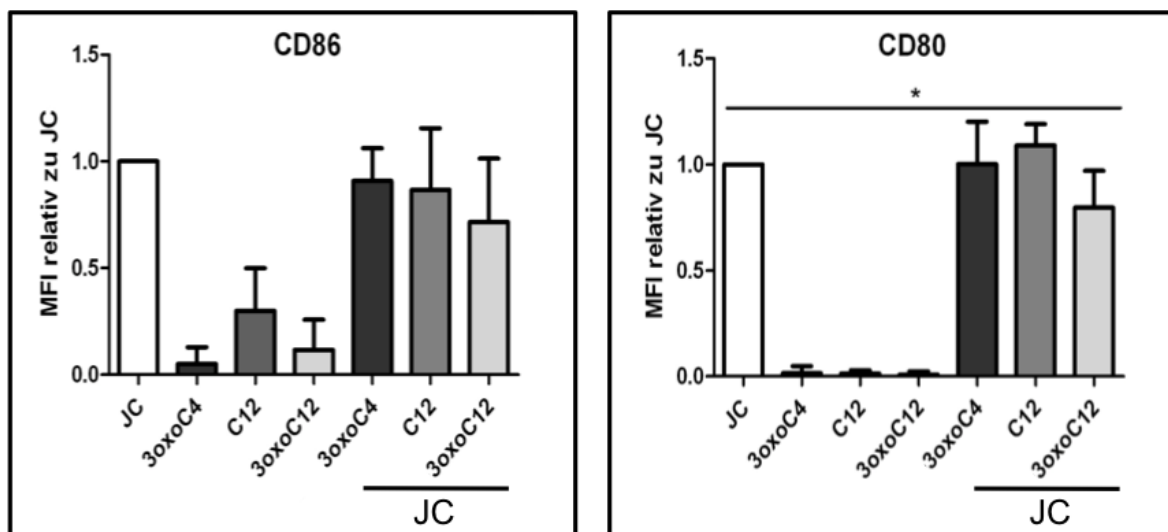


#### 4.5.2 Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) reifer Dendritischer Zellen

Die Dichte der Maturationsmarker auf DZ, die mit JC und **3oxoC<sub>4</sub>-HSL** stimuliert worden waren, entsprach mit 91-100% in etwa der Positivkontrolle. Ausgenommen davon war CD40, dessen Expression bei 141% pro DZ lag. Für den Migrationsmarker CD184 zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Markermolekülen pro Zelle (136%). Für CD197 war die MFI mit 73% erniedrigt.

Auf **JC-C<sub>12</sub>-HSL**-gereiften DZ schien die Anzahl der Maturations- und Migrationsmarkermoleküle durchweg erhöht mit Werten zwischen 109% bis 146% verglichen mit der Positivkontrolle. Eine Ausnahme stellte CD86 dar, welches eine MFI von 87% zeigte. CD40 wurde aus technischen Gründen von der Messung ausgenommen.

Die Stimulation mit JC und **3oxoC<sub>12</sub>-HSL** ergab eine verminderte Expression von CD86 (72%), CD80 (80%) und HLA-DR (73%) pro DZ. CD40 lag mit 97% im Bereich der Positivkontrolle, wohingegen CD83 mit 115% und die Migrationsmarker CD184 (117%) und CD197 (142%) eine deutlich höhere Oberflächendichte zeigten.



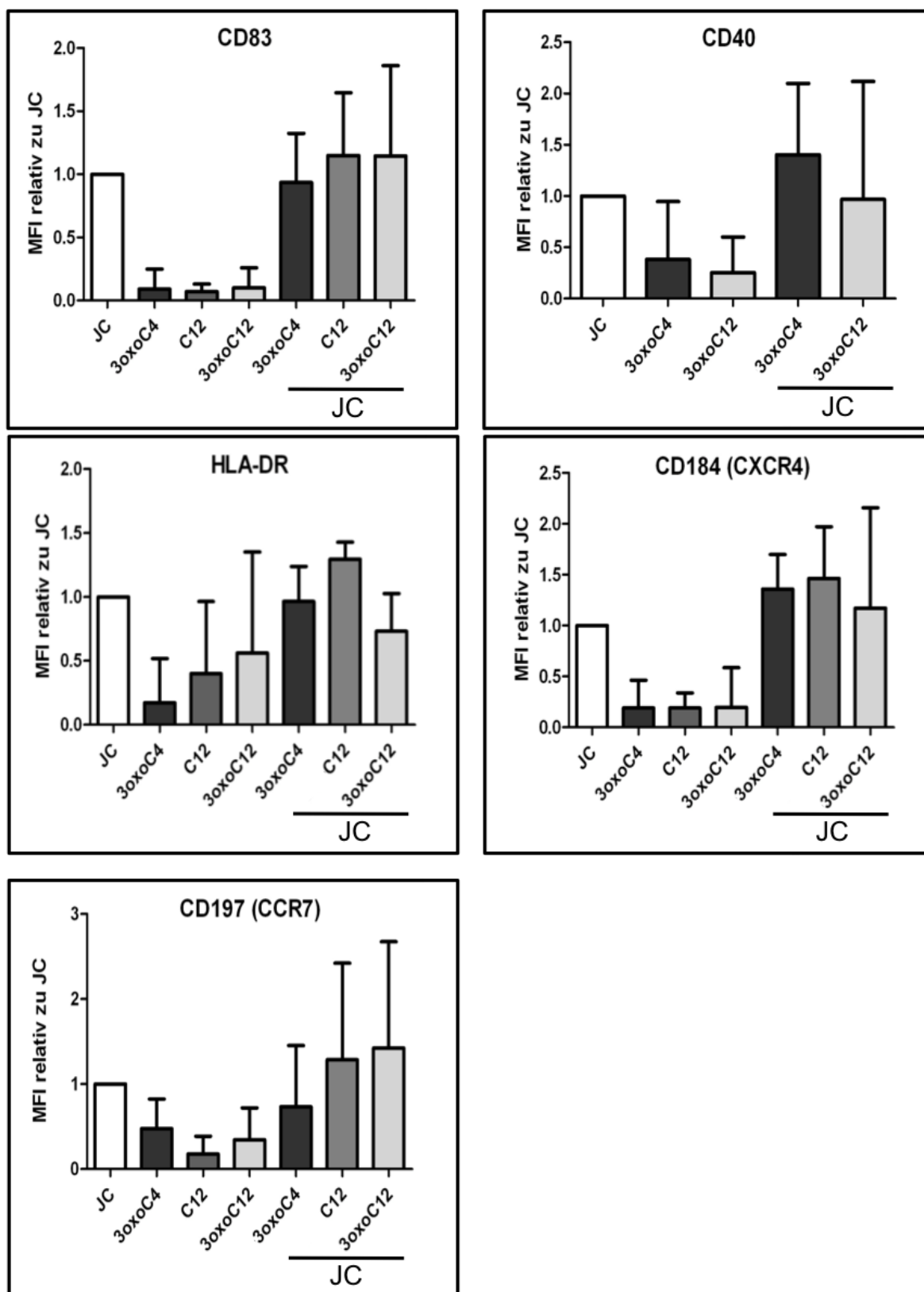


Abb. 13: Expression der Maturationsmarker CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR und Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60 µM) mit und ohne JC. Alle Werte sind relativ zu JC (100%). Dunn's Multiple Comparison Test, \* =  $p < 0,05$ . Arithmetisches Mittel mit Standardfehler (Fehlerbalken). (CD86/CD80/CD83:  $n = 7$ , CD40:  $n = 3$ , HLA-DR/CD184/CD197:  $n = 4$ ; für C12-HSL und LPS+C12-HSL:  $n = 3$ )

### 4.5.3 Vergleich der beiden Messgrößen (Prozentualer Anteil und MFI)

Wurden DZ mit JC und **3oxoC<sub>4</sub>-HSL** stimuliert, zeigte sich eine im Vergleich mit der Positivkontrolle geringere Anzahl CD86<sup>+</sup> DZ (73%), wohingegen die Moleküldichte pro Zelle mit einer MFI von 91% kaum erniedrigt war. Noch ausgeprägter fand sich dieser Unterschied bei HLA-DR, für welches nur 47% DZ positiv waren, dessen MFI mit 97% dagegen vergleichbar war mit der Positivkontrolle. Für den Chemokinrezeptor CD197 war unter diesen Bedingungen der prozentuale Anteil positiver Zellen stark erhöht (215%), die Zahl der Moleküle pro Zelle dabei mit 73% deutlich geringer als bei der Positivkontrolle.

DZ, die mit JC und **C<sub>12</sub>-HSL** inkubiert worden waren, zeigten beim Vergleich vom Prozentsatz positiver Zellen mit der Moleküldichte pro Einzelzelle die gleiche Tendenz, wobei beide Werte gegenüber der Positivkontrolle erhöht waren. Eine Ausnahme stellte CD86 dar, für welches sowohl insgesamt geringfügig weniger DZ positiv waren (91%) als auch pro Zelle weniger Moleküle ausgebildet wurden (MFI = 87%), jeweils bezogen auf die Positivkontrolle. Die Werte für den prozentualen Anteil und MFI lagen bei dem Migrationsmarker CD197 unter diesen Stimulationsbedingungen mit 253% gegenüber 129% weit auseinander. Während also die Zahl der Moleküle pro Zelle verglichen mit der Positivkontrolle nur mäßig stieg, war der Prozentsatz CD197<sup>+</sup> Zellen auf das 2,5-fache erhöht.

Bei JC-**3oxoC<sub>12</sub>-HSL**-gereiften DZ lag der Anteil CD86<sup>+</sup> (52%), CD80<sup>+</sup> (76%) und HLA-DR<sup>+</sup> (40%) Zellen deutlich unter der Positivkontrolle. Auf Einzelzellebene war der inhibierende Effekt von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL nicht ganz so ausgeprägt mit einer MFI von 72% für CD86, 80% für CD80 und 73% für HLA-DR. Die übrigen Marker lagen im Bereich der Positivkontrolle bzw. überstiegen sie um bis zu 44%. Auffällig war auch hier die Expression des Chemokinrezeptors CD197, für den fünfmal so viele Zellen positiv waren wie unter alleiniger JC-Stimulation. Die MFI von CD197 lag bei 142%.

Insgesamt zeigte sich bei den drei Stimulationsbedingungen für den Chemokinrezeptor CD197 eine große Diskrepanz zwischen dem Prozentsatz positiver DZ und der MFI. Während der Anteil der CD197<sup>+</sup> Zellen gemessen an der Gesamtpopulation der DZ sehr stark zunahm, war dessen Expression auf Einzelzellebene kaum erhöht bzw. für JC-3oxoC<sub>4</sub>-HSL-gereifte Zellen erniedrigt, jeweils relativ zur Positivkontrolle.

## 4.6 Zusammenfassung der Wirkung von AHL auf die Reifung Dendritischer Zellen

Die Zugabe von **3oxo-C<sub>4</sub>-HSL** zeigte keinen Effekt auf LPS-gereifte DZ. Ausgenommen davon war der Chemokinrezeptor CD197, dessen Expression mit 56% positiver Zellen und einer MFI von 38% stark erniedrigt war. Auch bei JC-stimulierten DZ fand sich mit Ausnahme der Oberflächenmarker CD86 und HLA-DR keine Maturationshemmung.

Bei der Coinkubation mit **C<sub>12</sub>-HSL** und LPS wurde eine Herabregulierung der Expression von CD83, CD40, CD184 und CD197 beobachtet. Auf Einzelzellebene (MFI) erschienen alle gemessenen Oberflächenmarker ausgenommen HLA-DR und CD40 vermindert. Auf JC-stimulierte DZ zeigte C12-HSL dagegen keine inhibitorische Wirkung.

Signifikant gehemmt wurde die Expression von CD86, CD80, CD83 und HLA-DR durch Zugabe von **3oxoC<sub>12</sub>-HSL** zu LPS-stimulierten Zellen. Bei den übrigen Markern ließ sich eine gleichsinnige Tendenz beobachten. Bei JC-maturierten DZ war nur eine schwache bzw. keine Suppression messbar.

Insgesamt war der inhibitorische Effekt der AHL, allen voran von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL, bei Stimulation mit LPS deutlich stärker ausgeprägt als mit JC.

## 4.7 Einfluss der AHL auf die Zytokinsekretion Dendritischer Zellen

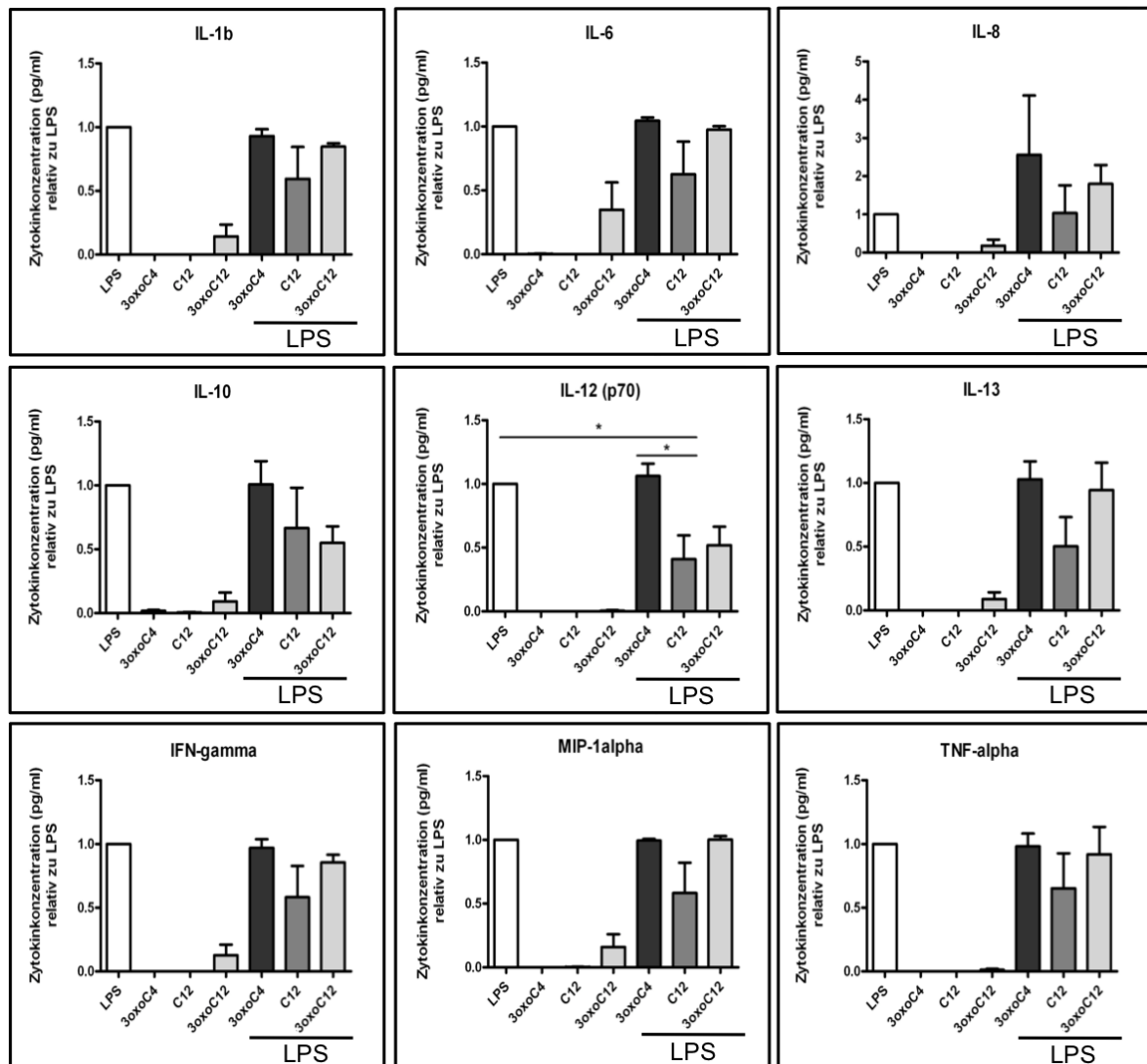
### 4.7.1 Zytokinsekretion nach Maturation mit AHL und LPS

Bei Zugabe von **3oxoC<sub>4</sub>-HSL** zu LPS-gereiften DZ ergab sich kein Einfluss auf deren Zytokinsynthese verglichen mit der Positivkontrolle. Lediglich die Synthese des pro-inflammatorischen IL-8 war auf das 2,5-fache gesteigert.

Mit LPS und **C<sub>12</sub>-HSL** kultivierte DZ zeigten eine herabgesetzte Sekretion für alle gemessenen Zytokine (41-68% der Positivkontrolle), allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Auch hier zeigte IL-8, dessen Konzentration (108%) der Positivkontrolle gleichkam einen dem entgegengesetzten Trend.

**3oxoC<sub>12</sub>-HSL** führte zu einer verminderten Produktion der entzündungsfördernden Zytokine IL-1beta (85%), IL-12 (52%) und IFN-gamma (85%) durch LPS-stimulierte DZ und des entzündungshemmenden IL-10 (55%), wohingegen die Konzentration der übrigen Zytokine unbeeinflusst war. Auch unter diesen Stimulationsbedingungen kam es zur

erhöhten Sekretion von IL-8 von 180% gemessen an der Positivkontrolle. Auch hier erreichten die Unterschiede keine statistische Signifikanz.



**Abb. 14:** Zytokinsekretion (IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TNF-alpha) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60 µM) mit und ohne LPS. Zytokinsekretion gemessen in pg/ml. Alle Werte sind relativ zu LPS (100%). Dunn's Multiple Comparison Test, \* =  $p < 0,05$ . Arithmetisches Mittel mit Standardfehler (Fehlerbalken). (n= 5)

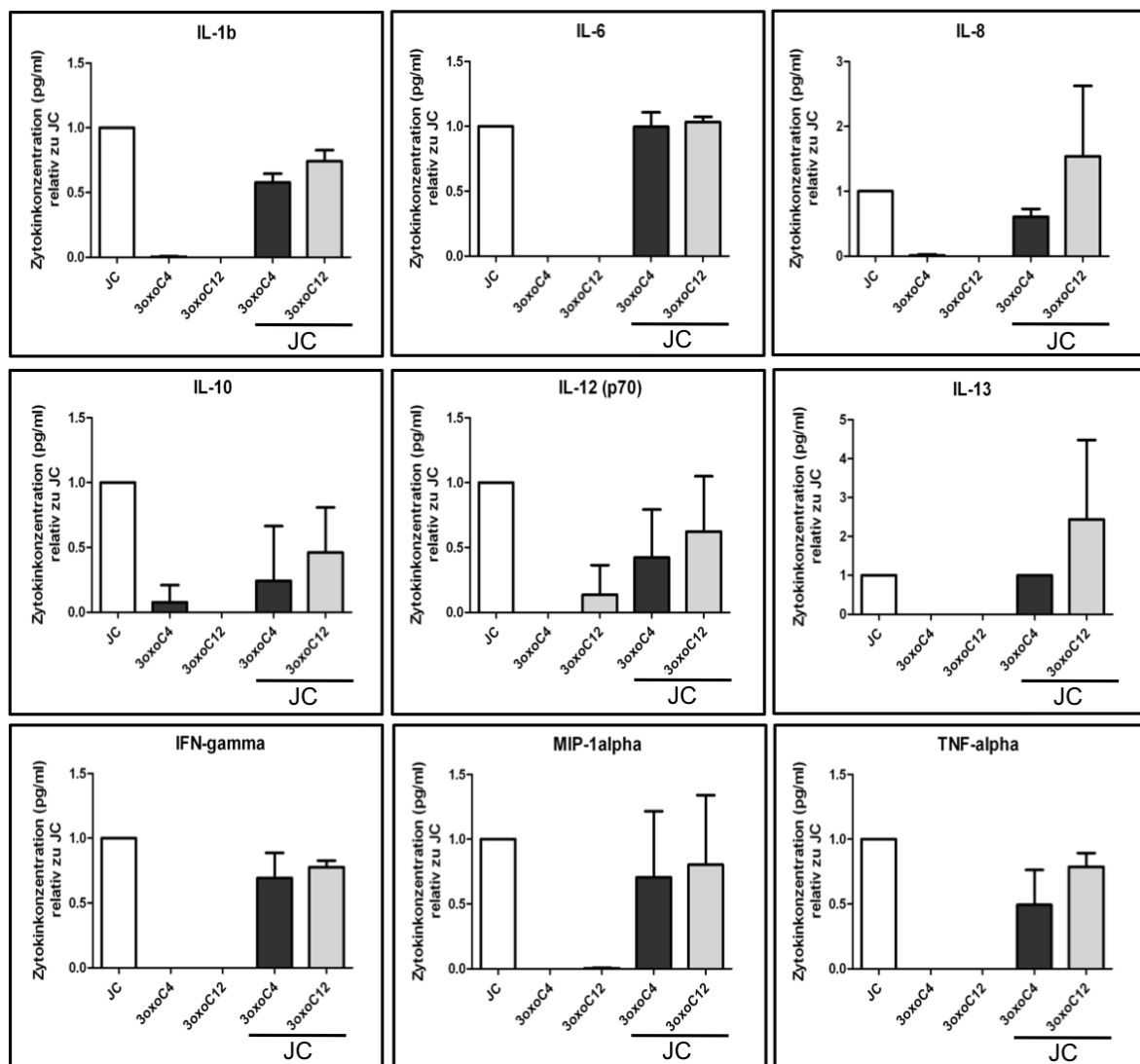
#### 4.7.2 Zytokinsekretion nach Maturation mit AHL und JC

**3oxoC<sub>4</sub>-HSL** wirkte hemmend auf die Sekretion der entzündungsfördernden Zytokine IL-1beta (58%), IL-8 (61%), IL-12 (36%), IFN-gamma (69%), MIP-alpha (71%) und TNF-alpha (49%) sowie auf das entzündungshemmende IL-10 (24%) durch JC-gereifte DZ. Die Konzentrationen von IL-6 und IL-13 entsprachen der Positivkontrolle.

Die Zytokinbestimmung in JC-C<sub>12</sub>-HSL-stimulierten DZ wurden aus technischen Gründen nicht durchgeführt.

Unter dem Einfluss von **3oxoC<sub>12</sub>-HSL** zeigte sich eine verringerte Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1beta (74%), IL-12 (62%), IFN-gamma (78%), MIP-alpha (80%) und TNF-alpha (79%). Es fand sich dagegen eine erhöhte Ausschüttung der ebenso entzündungsfördernden Zytokine IL-8 (154%) und IL-13 (244%). Die Sekretion von IL-6 war unbeeinträchtigt.

Alle Werte wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf, was in der niedrigen power, d.h. der geringen Anzahl (n) gemessener Proben (n = 3 für alle Zytokine, außer IL-13 mit n<sub>IL-13</sub> = 2), begründet sein könnte.



**Abb. 15:** Zytokinsekretion (IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IFN-gamma, MIP-1alpha, TNF-alpha) durch DZ nach Stimulation mit AHL (60 µM) mit und ohne JC. Zytokinsekretion gemessen in pg/ml. Alle Werte sind relativ zu JC (100%). Dunn's Multiple Comparison Test. Arithmetisches Mittel mit Standardfehler (Fehlerbalken). (n = 3, IL-13: n = 2)

#### 4.7.3 Vergleich der Wirkung von AHL auf die Zytokinsekretion in LPS- bzw. JC-stimulierten Dendritischen Zellen

Während **3oxoC<sub>4</sub>-HSL** inhibitorische Wirkung auf die Zytokinsynthese JC-maturierter DZ zeigte, blieb die Zytokinproduktion bei Stimulation mit LPS, mit Ausnahme von IL-8, unbeeinflusst.

Nach Coinkubation mit LPS und **C<sub>12</sub>-HSL** war die Synthese aller gemessenen Zytokine erniedrigt. Ausgenommen davon war auch hier IL-8, dessen Konzentration der Positivkontrolle entsprach. Aus technischen Gründen wurde die Zytokinsekretion der JC- **C<sub>12</sub>-HSL** aktivierten DZ nicht bestimmt.

**3oxoC<sub>12</sub>-HSL** wirkte in ähnlichem Maße inhibitorisch auf die Freisetzung der pro-inflammatorischen IL-1beta, IL-12 und IFN-gamma sowie auf das entzündungshemmende IL-10 bei LPS- und JC-kultivierten DZ. Unter beiden Stimulationsbedingungen kam es zur erhöhten Ausschüttung von IL-8. Bei JC-maturierten DZ senkte **3oxoC<sub>12</sub>-HSL** außerdem die Sekretion von MIP-1alpha und TNF-alpha.

Insgesamt konnte eine Inhibition der entzündungsfördernden Zytokinantwort durch 3oxoC<sub>12</sub>-HSL sowohl bei LPS- als auch bei JC-stimulierten DZ gezeigt werden. Ausgenommen davon war das pro-inflammatorische Zytokin IL-8, welches jeweils deutlich erhöht war. Das entzündungshemmende Signal in Form von IL-10 war in beiden Ansätzen erniedrigt.

## 5. Diskussion

### 5.1 Das *P. aeruginosa* Quorum Sensing Molekül 3oxoC<sub>12</sub>-HSL

#### 5.1.1 Vorkommen und Verteilung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL

Gram-negative Keime nutzen Acylierte Homoserinlactone (AHL) zur interbakteriellen Kommunikation. Mit zunehmender Keimzahl steigt auch deren Produktion von AHL Molekülen, welche ihrerseits die Sekretion weiterer Quorum Sensing Moleküle induzieren. Damit in Einklang steht die Erkenntnis, dass die Konzentration an AHL in örtlich begrenzten Mikrokolonien und Biofilmen gram-negativer Bakterien wie *P. aeruginosa* besonders hoch ist (Hense et al., 2007). *In vitro* Versuche mit einem GFP-markierten *P. aeruginosa* Stamm ergaben für 3oxoC<sub>12</sub>-HSL Konzentrationen von 634 µM in artifiziellen Biofilmen und 14 nM in Flüssigkulturen. Soweit bekannt, stellt 3oxoC<sub>12</sub>-HSL damit das am stärksten vertretene AHL in Biofilmen dar (Charlton et al., 2000). Messungen von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL im Sputum (Erickson et al., 2002) und Lungengewebe (Favre-Bonté et al., 2002) von ZF-Patienten ergaben Werte im nano- bzw. femto-molaren Bereich. Eine Erklärung für die erheblichen Konzentrationsunterschiede zwischen Sputum- und Lungengewebsproben könnte darin bestehen, dass die Verteilung von *P. aeruginosa* bzw. AHL in der Lunge sehr heterogen ist. So kann man davon ausgehen, dass es in Biofilm-reichen Lungenregionen zur Anreicherung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL kommt, in weniger dicht besiedelten Teilen dagegen eine vergleichsweise geringe Konzentration zu finden ist. Zusätzlich ist die Aktivität des AHL durch seinen enzymatischen Abbau durch Paraoxonasen humaner epithelialer Atemwegszellen zeitlich limitiert. Dabei handelt es sich um zellmembrangebundene Enzyme, welche AHL inaktivieren, indem sie deren Lactonring hydrolytisch spalten (C. K. Chun, Ozer, Michael J Welsh, Zabner, & E P Greenberg, 2004; Draganov et al., 2005; Ozer et al., 2005). Die rasche Zersetzung der AHL durch Wirtsenzyme könnte zudem ein Grund sein für die Diskrepanz der 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-Konzentration in Proben von ZF-Patienten einerseits, und Biofilmen und Flüssigkulturen von *P. aeruginosa* Laborstämmen andererseits. Es erscheint wahrscheinlich, dass die entnommenen Sputum- und Lungengewebsproben eine wirksame Menge an Epithelzellen enthalten, die die AHL auch nach Entnahme der Proben inaktivieren. Andererseits wurde gezeigt, dass umgekehrt 3oxoC<sub>12</sub>-HSL die hydrolytische



Aktivität von Paraoxonasen mindert und auf diese Weise seine Inaktivierung hemmt (Horke et al., 2010).

Während 3oxoC<sub>12</sub>-HSL passiv, entlang einem Konzentrationsgefälle, in die Wirtszellen gelangt (Adam J Ritchie et al., 2007), wird es aus humanen Lungenepithelzellen aktiv über ATP-abhängigen Transport hinausbefördert (A. Bryan et al., 2010).

Weitere relevante Faktoren für die Stabilität der AHL ist der pH-Wert und die Temperatur ihrer Umgebung: Ein hoher pH-Wert (> 7.5) und Temperaturen über 22 °C führen zur hydrolytischen Öffnung des Lactonrings und somit zur Inaktivierung der AHL. Diese Reaktion ist durch Senkung des pH-Wertes auf einen Wert von 2,0 reversibel (Yates et al., 2002).

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass eine verlässliche Quantifizierung oder Hochrechnung der tatsächlichen Menge an AHL in klinischen Isolaten kaum möglich ist. Die vorliegenden Studien rechtfertigen jedoch die Annahme, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL lokal im Gewebe in biologisch relevanter Menge von 60 µM und mehr vorkommt.

Bisher ist wenig bekannt über die Vielfalt und den Anteil AHL-produzierender und AHL-defizienter *P. aeruginosa*-Stämme in ZF-Patienten oder über die genaue klinische Auswirkung des individuellen Keimprofils (Wilder, Allada, & Schuster, 2009). So wurden *P. aeruginosa*-Stämme beschrieben, die zwar selbst keine AHL produzierten, aber dennoch über QS-regulierte Virulenzfaktoren verfügten (Schaber et al., 2004; Tingpej et al., 2007). Auch scheint die Produktion von AHL im zeitlichen Verlauf der ZF-Erkrankung abzunehmen. Nach einer Erkrankungsdauer von zwölf Jahren beobachtete man einen Funktionsverlust des 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-produzierenden las-Systems in ca. 75% der untersuchten ZF-Patienten (Bjarnsholt et al., 2010). Trotz der verminderten Virulenz AHL-defizienter *P. aeruginosa*-Stämme erscheint eine Eradikation des Keimes in derart fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung allerdings unwahrscheinlich.

### **5.1.2 Wirkungen von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf Immunzellen**

Es wurde mehrfach gezeigt, dass Quorum Sensing Moleküle zusätzlich zu ihrer Funktion als Signalmoleküle der interbakteriellen Kommunikation auch die humane Immunantwort beeinflussen (A J Ritchie, 2003; G Telford et al., 1998). Da *P. aeruginosa* sich zunehmend resistent gegen ein breites Spektrum von Antibiotika zeigt, könnte das QS-System einen alternativen Angriffspunkt zur Bekämpfung des Keims bieten.

Bisher ist noch unzureichend geklärt, welche Faktoren entscheidend für die Virulenz der AHL sind. Eine bedeutende Rolle spielen ein intakter Homoserinlacton-Ring, eine Oxo- oder Hydroxy-Gruppe, sowie die Kettenlänge der Acylgruppe (mindestens C<sub>11</sub>) (Chhabra et al., 2003; Horikawa et al., 2006). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Kontrollen mitgeführt, die jeweils entweder in der Kettenlänge oder in der Oxo-Gruppe mit 3oxoC<sub>12</sub>-HSL übereinstimmten.

Weiterhin wurde mit einer AHL Konzentration gearbeitet, für die eine toxische Wirkung auf Dendritische Zellen nach 24-stündiger Inkubation eindeutig ausgeschlossen werden konnte. Die kritische Konzentration von AHL scheint stark zu variieren und ist abhängig von der Zellart bzw. dem Versuchsmodell. So induzierte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in einer Konzentration von 12-50 µM Apoptose in Makrophagen aus murinem Knochenmark; die Behandlung mit C<sub>4</sub>-HSL in denselben Konzentrationen zeigte keine Wirkung auf die Zellen (Kazuhiro Tateda et al., 2003). Während 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in einer Konzentration von 10 µM keine Auswirkung auf die Viabilität muriner T-Zellen zeigte, führte eine Dosis von 1-10 µM zum Zelltod in murinen Monozyten und Neutrophilen. In einer Konzentration von ≥ 50 µM führte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in murinen, aus dem Knochenmark gewonnenen DZ zum Zelltod (Skindersoe et al., 2009). Die hohe Empfindlichkeit mononukleärer Zellen gegenüber 3oxoC<sub>12</sub>-HSL konnte auch in Versuchen mit menschlichen Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil apoptotischer Zellen nach 24-stündiger Inkubation humaner, LPS-maturierter DZ stieg um 15% bei Zugabe von 100 µM 3oxoC<sub>12</sub>-HSL (P Boontham & A Robins, 2008). Die Zellviabilität humaner polymorphonukleärer Neutrophiler (PMN) blieb dagegen von der gleichen Dosis 3oxoC<sub>12</sub>-HS (100 µM) unbeeinträchtigt (C. Wagner et al., 2007).

Aus diesen Daten geht hervor, dass für jedes Versuchsmodell abhängig von der Spezies und Zellart eine individuelle nicht-toxische Konzentration von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL ermittelt werden muss, bevor eventuelle Effekte der AHL auf die entsprechenden Zellen untersucht werden können.

### **5.1.3 Wirkmechanismus von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL**

Weitgehend unklar ist der genaue Wirkmechanismus der AHL. In DZ wird eine Interaktion mit dem Toll-like Rezeptor (TLR) 4 angenommen, die zu einer Hemmung der TLR4-vermittelten Wirkung von LPS und anderen bakteriellen Antigenen führt (Adam J Ritchie et al., 2007). In LPS-stimulierten humanen Alveolar- und Knochenmarksmakrophagen

inhibierte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in einer Konzentration von 10-25 µM die NF-κB-abhängige Expression inflammatorischer Zytokine und anderer immunregulatorischer Moleküle (Kravchenko et al., 2008). Die hemmende Wirkung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen scheint auf mehreren Ebenen der Signalübertragung stattzufinden. Neben dem T-Zellrezeptor (TZR), scheint 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auch intrazellulär mit Strukturen des Zytoplasmas und Zellkerns zu interferieren (A J Ritchie et al., 2005; Adam J Ritchie et al., 2007). Nach unserem Wissensstand, ist bislang keine Struktur in humanen Zellen identifiziert, an die 3oxoC<sub>12</sub>-HSL spezifisch bindet. Die hohe Variabilität der Effekte von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in unterschiedlichen Versuchsmodellen lässt eine unspezifische Interaktion von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL mit Molekülen der Zellmembran (z.B. TZR) oder des Zytoplasmas, beispielsweise mit Bestandteilen der NF-κB-Kaskade, vermuten.

In dieser Arbeit zeigte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL eine hemmende Wirkung auf die LPS-vermittelte Aktivierung von DZ. Dies weist darauf hin, dass die TLR4-abhängige Übertragung des LPS Signals durch Wechselwirkung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL mit TLR4 oder nachgeschalteter Moleküle beeinträchtigt ist. Demzufolge würden DZ an der Generierung einer entsprechenden Immunantwort zur Bekämpfung des Pathogens gehindert werden, was eine Ausbreitung des Keimes im Körper, chronische Besiedlung der Gewebe und schließlich eine Insuffizienz der betroffenen Organe (v.a. Lunge) und daraus folgendem Tod nach sich zieht.

Um zu untersuchen, ob die 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-vermittelte Wirkung auf die Zellen von deren Expression von TLR4 abhängig ist, wurde in einem Ansatz Jonuleit Zytokin-Cocktail (JC) anstelle von LPS zur Aktivierung der DZ verwendet. Die Zytokin-vermittelte Stimulation der Zellen erfolgt auf TLR4-unabhängigem Wege und führt verglichen mit LPS zu einem höheren Aktivierungsgrad der DZ. Dies ist v.a. auf das in JC enthaltene TNF-alpha und PGE<sub>2</sub> zurückzuführen (Jonuleit et al., 1997; Rieser, Böck, Klocker, Bartsch, & Thurnher, 1997; Steinbrink et al., 2000). Unsere Versuche zeigten, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL, wenn auch in geringerem Maße, die Maturation JC-behandelter DZ inhibierte. Aus dieser Beobachtung folgerten wir, dass die Wirkung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL nicht oder nicht ausschließlich von TLR-4 abhängig ist.

## 5.2 Quorum Sensing-bezogene Therapieansätze

Miyairi et al. impften Mäuse mit dem 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-Carrier Protein 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-BSA und induzierten auf diese Weise die Produktion signifikanter Mengen spezifischer Antikörper gegen 3oxoC<sub>12</sub>-HSL. Anschließend wurden die Tiere mit dem *P. aeruginosa* Laborstamm PAO1 infiziert. Vier Tage nach Infektion lebte noch ein Drittel der geimpften Mäuse, wohingegen alle nicht-immunisierten Tiere der Referenzgruppe innerhalb von zwei Tagen verstarben. Interessanterweise fanden sich keine Unterschiede bezüglich der Keimzahl in post mortem entnommenen Lungenproben der beiden Gruppen. Die Menge an TNF-alpha im Lungengewebe der vakzinierten Mäuse war dagegen signifikant erniedrigt verglichen mit der Kontrollgruppe. Außerdem wurde die Konzentration von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL im Serum und homogenisierten Lungengewebe der Tiere bestimmt. In der Impfgruppe ergaben sich um 70% bzw. 90% niedrigere Werte als in der Gruppe nicht-immunisierter Tiere (Miyairi et al., 2006).

Als gram-negativer Keim besitzt *P. aeruginosa* eine intrinsische Resistenz gegenüber Makrolidantibiotika, deren Wirkungsspektrum sich auf gram-positive Bakterien beschränkt. Erstaunlicherweise kam es unter der Behandlung eines *P. aeruginosa*-infizierten ZF-Patienten mit Makroliden zu einer auffälligen Besserung des klinischen Zustandes. In nachfolgenden Studien ergab die Gabe von Makroliden über einen Zeitraum von sechs Monaten eine signifikante Zunahme der Atemfunktion und des Gewichts sowie eine Abnahme von Exazerbationen bei ZF-Patienten. Auch die Dauer des Krankenhausaufenthalts sowie intravenöser Behandlung mit Antibiotika verkürzte sich unter Makrolid-Therapie. Daraufhin durchgeführte *in vitro* Versuche mit *P. aeruginosa* Stämmen zeigten eine Abnahme der Virulenzfaktorproduktion (Hirakata et al., 1992; Kita et al., 1991; Molinari, Paglia, & Schito, 1992). Diese Ergebnisse veranlassten Tateda et al. dazu, den Einfluss von Makroliden auf das QS-System von *P. aeruginosa* zu untersuchen. Verglichen mit der Kontrolle, fanden sie neben einer um 80% herabgesetzten Expression des *lasI*-Gens, eine um 94% niedrigere Konzentration von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL (Kazuhiro Tateda et al., 2007).

Allerdings zeigten längerfristige Studien über mindestens zehn Monate im Anschluss an die anfängliche Zunahme einen Rückgang der Lungenfunktion zu Ausgangswerten vor Therapiebeginn (Zusammenschau in Crosbie & Woodhead, 2009). Der Beweis einer langfristigen Wirksamkeit von Makroliden bei der Behandlung *P. aeruginosa*-infizierter ZF-Patienten steht demnach noch aus.

### 5.3 Generierung humaner Dendritischer Zellen

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des *P. aeruginosa* Quorum Sensing Moleküls 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf die Reifung humaner Dendritischer Zellen zu untersuchen. Dazu wurden Dendritische Zellen aus peripheren Blutmonozyten gesunder Nichtraucher mittels Plastikadhärenz und durch Zugabe von Zytokinen generiert. Da aktivierte Lymphozyten in der Lage sind, an Monozyten zu binden und diese zu stimulieren (Weyrich et al., 1996), wurden sie in einem vorausgehenden Zentrifugationsschritt eliminiert. Eine bekannte Methode für die Gewinnung einer reinen CD14<sup>+</sup> Monozytenpopulation ist das immunomagnetische Selektionsverfahren mit magnetischen Beads. Bei Vorversuchen zeigte sich allerdings eine wahrscheinlich rezeptorvermittelte Voraktivierung der Zellen durch die Beads. Aus diesem Grund wurde auf dieses selektivere Verfahren verzichtet und zur Isolation die Eigenschaft der Monozyten genutzt, an Plastikoberflächen zu adhären. Ein Nachteil dieses weniger selektiven Verfahrens ist eine Kontamination der so gewonnen Zellpopulation durch B- und T-Lymphozyten (S. Bennett & Breit, 1994), die auch durch nachfolgende Waschschrte nicht vollständig beseitigt werden. Aus diesem Grund wurde in jedem Versuchsansatz eine Negativkontrolle (DZ, die nicht mit AHL und/oder LPS oder Zytokin Cocktail behandelt wurden) mitgeführt. Die DZ der Negativkontrolle unterlagen demnach ausschließlich dem Aktivierungseinfluss der nicht entfernten Lymphozyten. Der Ergebniswert der Negativkontrolle wurde von dem Ergebniswert der einzelnen Behandlungsbedingungen (LPS, LPS + 3oxoC<sub>4</sub>-HSL, LPS + C<sub>12</sub>-HSL, LPS + 3oxoC<sub>12</sub>-HSL, usw.) für jeden einzelnen Marker subtrahiert und auf diesem Wege eine mögliche Mitaktivierung durch Lymphozyten mathematisch beseitigt.

Aus den so gewonnenen Monozyten wurden durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 unreife DZ generiert. Hierbei handelt es sich um eine etablierte und mehrfach beschriebene Methode (F Sallusto & A Lanzavecchia, 1994). Die auf diese Weise generierten DZ entsprechen morphologisch den in vorhergehenden Arbeiten beschriebenen DZ (Turner et al., 1999; Zobywalski et al., 2007).

## 5.4 Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf die Reifung Dendritischer Zellen

### 5.4.1 Expression von Oberflächenmarkern

Ein Zeichen für den Aktivierungsgrad Dendritischer Zellen ist deren Expression von charakteristischen Oberflächenmolekülen, darunter v.a. CD86, CD80, CD83, CD40 und HLA-DR. Diese Moleküle sind notwendig für die nachfolgende Aktivierung von T-Zellen, indem sie entweder an deren TZR binden (HLA-DR) oder als costimulatorische Signale (CD86, CD80, CD83, CD40) dienen (Banchereau & Steinman, 1998).

Um die immunmodulatorische Wirkung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu untersuchen, wurde die Reifung von DZ mithilfe von LPS oder JC induziert und mit 3oxoC<sub>12</sub>-HSL coinkubiert. Die Cokultivierung der Zellen mit JC und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zeigte eine geringere Hemmung der Markerexpression als die Cokultivierung mit LPS und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL. Zu einer statistisch signifikanten Senkung des prozentualen Anteils von CD86<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> und HLA-DR<sup>+</sup> DZ kam es nach Inkubation mit LPS und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL, nicht aber mit JC und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL. Ähnliches galt für die Markerdichte auf Einzelzellebene: Hochsignifikant geringer war die Zahl von CD86-, CD80- und CD83-Molekülen auf LPS- und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL-gereiften Zellen relativ zur Positivkontrolle. Auf JC-3oxoC<sub>12</sub>-HSL-aktivierten DZ hingegen war lediglich die Expression von CD80 statistisch signifikant erniedrigt. Auf die Expression von CD83 und CD40 hatte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL bei JC-stimulierten DZ keinen messbaren Effekt.

Auffällig war der Unterschied zwischen beiden Kultivierungsansätzen in der Expression der Migrationsmarker CD184 und CD197: Während 3oxoC<sub>12</sub>-HSL bei LPS-stimulierten DZ den Prozentsatz positiver Zellen und die Moleküldichte pro Zelle senkte, fand sich eine Steigerung der Chemokinrezeptor-Expression nach Zugabe des 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu JC-gereiften DZ, sowohl prozentual als auch auf Einzelzellebene. Die Diskrepanz der Effekte von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL unter den zwei Stimulationsbedingungen kann der Tatsache zugeschrieben werden, dass die JC-Zytokine, v.a. TNF-alpha und PGE2, ein stärkeres Aktivierungspotential besitzen als LPS. Ein weiterer Grund dafür könnte sein, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL wie weiter oben beschrieben mit TLR4 interagiert, der bei der Aktivierung der Zellen mit Zytokincocktail umgangen wird.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse stimmen mit den Daten aus den wenigen veröffentlichten Studien an DZ überein. So wurde eine verminderte Expression des Reifungsmarkers CD86 auf DZ nach 24-stündiger Kultivierung mit 1 µg/ml LPS und

100  $\mu\text{M}$  3oxoC<sub>12</sub>-HSL beobachtet (Pisake Boontham et al., 2008). Im Mausmodell zeigte sich eine Senkung der Moleküldichte für CD86, CD80 und CD40 bei Coinkubation der Zellen mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in Konzentrationen zwischen 5-30  $\mu\text{M}$  (Skindersoe et al., 2009).

Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die in früheren Studien gezeigte immunmodulatorische Wirkung des *P. aeruginosa* Quorum Sensing Moleküls 3oxoC<sub>12</sub>-HSL. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL schon sehr früh in der Aktivierungskaskade beider Teile des Immunsystems (angeboren und erworben) eingreift, indem es die Reifung Dendritischer Zellen inhibiert. Ein Mangel an HLA-DR und costimulatorischer Oberflächenmoleküle hindert die DZ an der Aktivierung naiver T-Zellen.

Die hier beschriebenen Daten weisen darauf hin, dass die Wanderung der DZ in sekundäres lymphatisches Gewebe, dem Ort der T-Zell-Aktivierung, durch Herabregulierung der Migrationsmarker-Expression beeinträchtigt ist. Die Ausbildung der Chemokinrezeptoren CXCR4 (CD184) und CCR7 (CD197) ist entscheidend für die Fähigkeit der Zellen, auf den chemotaktischen Reiz der Liganden CXCL12 und CCL19 zu reagieren und in lymphatische Organe zu wandern (Martín-Fontecha et al., 2003; Villablanca et al., 2008). Ein Mangel an Chemokinrezeptoren verhindert die Migration der DZ und beeinträchtigt ihre Funktion als antigenpräsentierende Zellen. Demzufolge bleibt die Aktivierung von naiven T-Zellen und somit des angeborenen Immunsystems aus.

#### 5.4.2 Zytokinproduktion

Die Menge und Art der von DZ sezernierten Zytokine und Chemokine bestimmt den Typ der T-Zellantwort. Werden vermehrt Typ1-T-Helferzellen (Th1-Zellen) aktiviert, kommt es zur zellulären, entzündungsfördernden Immunantwort; Typ2-T-Helferzellen dagegen induzieren durch Aktivierung von B-Lymphozyten eine humorale Immunreaktion (A J Ritchie, 2003; Skindersoe et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration von neun Zytokinen im Überstand LPS- bzw. JC-maturierter DZ mit und ohne Zugabe von AHL gemessen. Zytokine dienen neben DZ auch anderen Zelltypen wie T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) als interzelluläre Botenstoffe. Da bei der Isolation mittels Plastikadhärenz mit einer Kontamination der DZ-Kultur mit Lymphozyten zu rechnen ist, kann ein geringer Teil der Zytokinproduktion diesen Zellen

zugeschrieben werden. Zum Teil überschneidet sich das Sekretionsmuster der verschiedenen Zelltypen; so werden IFN-gamma, MIP-1alpha, MIP-1beta und IL-8 sowohl von DZ als auch von NK-Zellen und T-Zellen sezerniert (Banchereau et al., 2000; Kim, 2004). Vor dem Hintergrund, dass in Vorversuchen der Anteil von CD16<sup>+</sup> Zellen (NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten, neutrophile polymorphnukleäre Leukozyten) lediglich 4% betrug, ist davon auszugehen, dass der Beitrag von NK-Zellen zur Zytokinproduktion unwesentlich war.

Sowohl bei LPS- als auch bei JC-stimulierten DZ führte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zur deutlichen Mehrsekretion des entzündungsfördernden IL-8. IL-8 wird u.a. von Epithelzellen sezerniert und wirkt vor allem chemotaktisch auf Neutrophile, welche es zur Migration zum Entzündungsort veranlasst. Nach *in vitro* Inkubation von humanen Atemwegsepithelzellen mit 30-100 µM 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zeigten diese eine gesteigerte IL-8-Produktion (DiMango, Zar, R. Bryan, & Prince, 1995). Diese Ergebnisse erklären die erhebliche Zahl an Gewebe destruierenden Neutrophilen in Lungenabschnitten, die chronisch mit *P. aeruginosa* besiedelt sind.

Reife wie auch unreife DZ sezernieren nach Kontakt mit Pathogenen oder deren Bestandteilen (z.B. LPS, DNA) das pro-inflammatorische IL-12 und induzieren auf diese Weise die Ausschüttung von IFN-gamma durch Th1-Zellen und NK-Zellen, welches rückwirkend die IL-12-Produktion steigert (G Trinchieri, 2003). In unseren Versuchen war die Konzentration von IL-12 im Überstand bei Zugabe von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu LPS- und JC-gereiften DZ um fast die Hälfte niedriger als in der Positivkontrolle. Einen ähnlichen Effekt hatte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL in einer Dosis von 30-50 µM auf murine LPS-stimulierte DZ aus dem Knochenmark, in denen es die IL-12-Sekretion dosisabhängig senkte (Skindersoe et al., 2009). Auch in murinen Makrophagen war die IL-12-Produktion nach Coinkubation mit LPS und 5-30 µM 3oxoC<sub>12</sub>-HSL erniedrigt. Daneben fand sich eine verminderte Proliferation von Lymphozyten (G Telford et al., 1998). Diese Ergebnisse weisen auf eine entzündungshemmende Wirkung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL hin.

In früheren Arbeiten wurde der Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL (100 µM) auf die Zytokinsekretion humaner LPS-stimulierter DZ und die Art der T-Zell-Antwort untersucht (Pisake Boontham et al., 2008). Es zeigte sich eine Herabregulierung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF-alpha und IFN-gamma, die eine Th1-Zellantwort hervorrufen, wohingegen die Konzentration der entzündungshemmenden Th2-Zell-aktivierenden IL-4 und IL-10 erhöht war. Wir fanden eine geringfügige Erniedrigung der



IFN-gamma-Produktion bei Behandlung LPS- bzw. JC- maturierter DZ mit 3oxoC<sub>12</sub>-HSL. Zudem schien 3oxoC<sub>12</sub>-HSL die Sekretion von TNF-alpha und MIP-1alpha bei Coinkubation der Zellen mit JC und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu senken, nicht aber bei Kultivierung mit LPS und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL. Keinen Einfluss zeigte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf die Sekretion von IL-6 unter beiden Stimulationsbedingungen. Geringfügig erniedrigt war die Menge am pro-inflammatorisch wirkenden Zytokin IL-1beta im Überstand JC-3oxoC<sub>12</sub>-HSL-gereifter DZ, wohingegen 3oxoC<sub>12</sub>-HSL diesbezüglich keinen Effekt auf LPS-gereifte Zellen zu haben schien. Die anti-inflammatorische Wirkung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf das Zytokinsekretionsmuster von DZ scheint demnach abhängig von der Art des aktivierenden Stimulans (LPS oder Zytokin-Cocktail) und womöglich auch vom Ausmaß der DZ-Aktivierung.

Widersprüchliche Funktionen werden dem Th2-assoziierten Zytokin IL-13 zugeschrieben. Ursprünglich wurde es als anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin beschrieben, welches sowohl hinsichtlich seiner Genlokalisierung als auch funktionell eng mit dem immunmodulatorischen IL-4 verbunden ist (Minty et al., 1993). Andere Studien heben dagegen die entzündungsfördernde Wirkung von IL-13 in chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen hervor (Zheng et al., 2000). In diesem Zusammenhang findet sich eine IL-13-vermittelte Anreicherung von Makrophagen, Lymphozyten und anderen Immunzellen im entzündeten Gewebe. Unsere Daten zeigten keinen Einfluss auf die Konzentration von IL-13 im Überstand bei Zugabe von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu LPS-stimulierten DZ. Bei JC-aktivierten DZ hingegen war die Menge von IL-13 im Überstand unter dem Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf das Doppelte erhöht. Auch hier kann ein Teil der IL-13-Produktion durch T-Lymphozyten erfolgt sein. Die erhöhten Mengen an IL-13 im Überstand JC-3oxoC<sub>12</sub>-HSL-coinkubierter DZ gegenüber LPS-3oxoC<sub>12</sub>-HSL-behandelter Zellen lassen eine verstärkte Stimulation von DZ sowie Th2-Zellen durch JC vermuten. Dies könnte sich von dem weiter oben beschriebenen, höheren Aktivierungspotenzial von JC gegenüber LPS ableiten.

Das anti-inflammatorisch wirkende IL-10 war in den Überständen LPS-3oxoC<sub>12</sub>-HSL- und JC-3oxoC<sub>12</sub>-HSL-stimulierter DZ um fast die Hälfte geringer als in der jeweiligen Positivkontrolle. Neben DZ sezernieren auch T<sub>reg</sub> und Th2-Zellen das entzündungshemmende Zytokin IL-10. In Studien an Schleimhaut-assoziierten Immunzellen wurde gezeigt, dass die orale Verabreichung von proteinergen Antigenen zur systemischen Immuntoleranz bzw. Th2-gewichteten Immunantwort führt (Strober,

B. Kelsall, & Marth, 1998). IL-10 ist ein Signalmolekül von immunmodulatorischen Th2- und regulatorischen T-Lymphozyten (Iwasaki & B. L. Kelsall, 1999; McMenamin & Holt, 1993). Die geringen Mengen an IL-10 nach Zugabe von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu LPS- und JC-stimulierten DZ könnten darauf hinweisen, dass das AHL durch Einflussnahme auf die Maturation und Zytokinsekretion von DZ auch die IL-10-Produktion der T<sub>reg</sub> und Th-2-Zellen hemmt. Auf diese Weise würde die entzündungshemmende Th2-Zell-Antwort unterdrückt und ein chronisch-inflammatorisches Milieu geschaffen werden.

Insgesamt kam es unter dem Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zur Herabregulierung der Sekretion entzündungsfördernder Zytokine vor allem in JC-stimulierten DZ. Ausgenommen davon war das stark pro-inflammatorische, Neutrophilen-rekrutierende Zytokin IL-8, dessen Produktion nach Zugabe von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu LPS- und JC-stimulierten Zellen stieg. Da auch die Konzentration des immunmodulatorischen IL-10 unter dem Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL sank, ist eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse schwierig. Alles in allem scheint allerdings eine Verschiebung der T-Zell-Antwort zugunsten der Th-1-Lymphozyten zu stattzufinden. Anstelle der Th2-vermittelten Aktivierung von Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten und damit Eradikation des Keimes, schaffen Th1-Zellen ein eher entzündungsförderndes Milieu. Wie bereits weiter oben diskutiert, schützt sich *P. aeruginosa* zudem mithilfe seiner Biofilmproduktion gegen die Bekämpfung durch aktivierte Phagozyten und andere Immunzellen.

An dieser Stelle wurde lediglich der Effekt von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf LPS- bzw. JC-stimulierte DZ behandelt. Es zeigten sich allerdings auch erhebliche Veränderungen in der Zytokinproduktion unter dem Einfluss der Kontroll-AHL 3oxoC<sub>4</sub>-HSL und C12-HSL. Es bleibt offen, inwieweit diese Befunde spezifisch sind für die einzelnen Stoffe und welches die entscheidenden Strukturen der einzelnen Moleküle sind.

## 6. Zusammenfassung

Zystische Fibrose ist die häufigste vererbte letale Erkrankung in Europa, die trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie weiterhin mit einer verkürzten Lebenserwartung einhergeht. Einer der Hauptgründe verfrühter Sterblichkeit von Zystische Fibrose Patienten sind persistierende pulmonale Infektionen mit dem gram-negativen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*. Der Keim verfügt über ein interbakterielles Kommunikationssystem, das sogenannte Quorum Sensing, mithilfe dessen er nicht nur die Expression seiner Virulenzfaktoren reguliert, sondern auch Einfluss auf die Immunantwort des Patienten nimmt. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung des *P. aeruginosa* Quorum Sensing Moleküls 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf die Reifung humaner Dendritischer Zellen untersucht. Dendritische Zellen sind als professionelle Antigen-präsentierende Zellen essentielle Vermittler zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und in dieser Rolle von besonderer Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese chronischer, von Zellen des erworbenen Immunsystems aufrecht erhaltener Infektionen.

Um einen entzündlichen Zustand zu simulieren, wurden aus humanen, peripheren Monozyten differenzierte Dendritische Zellen mit Lipopolysaccharid oder Jonuleit Zytokin-Cocktail aktiviert und auf die Expression von Maturations- und Migrationsmarkern sowie Zytokinsekretion in Anwesenheit von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL untersucht. Bei LPS-stimulierten Dendritischen Zellen kam es in Anwesenheit von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu einer erniedrigten Expression der Reifungsmarker CD80, CD86, CD83, CD40, HLA-DR, sowie der Migrationsmarker CD184 (CXCR4) und CD197 (CCR7). Die Coinkubation mit Zytokin-Cocktail und 3oxoC<sub>12</sub>-HSL ergab eine Herabregulierung der Maturationsmarker CD80, CD86 und HLA-DR auf den behandelten Dendritischen Zellen. Auf unstimulierte Dendritische Zellen zeigte 3oxoC<sub>12</sub>-HSL keinen Effekt, das Oberflächenmarker-Expressionsprofil dieser Zellen glich dem unreifer Dendritischer Zellen.

Auch auf die Zytokinsekretion wirkte die Zugabe von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL zu LPS- bzw. Zytokin-Cocktail-gereiften Dendritischen Zellen inhibitorisch. Im Überstand Zytokin-aktivierter und, in geringerem Maße, LPS-stimulierter Dendritischer Zellen wurde in Anwesenheit von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL eine verminderte Konzentration entzündungsfördernder Zytokine (IL-12, IFN-gamma, MIP-1alpha, TNF-alpha) sowie des immunmodulierenden

IL-10 gemessen. Die Konzentration des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 war dagegen in beiden Ansätzen erhöht. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL die Reifung Dendritischer Zellen unterdrückt und somit das Zustandekommen einer effektiven Immunantwort verhindert wird. Es liegt nahe, dass die auf diese Weise beeinträchtigte Immunabwehr nicht in der Lage ist, *P. aeruginosa* erfolgreich zu bekämpfen und die chronische Besiedelung mit dem Keim maßgeblich zum Versagen der Lungenfunktion und zur verfrühten Sterblichkeit in betroffenen Patienten beiträgt.

Weitere Studien sind nötig, um die Auswirkungen der Reifungshemmung Dendritischer Zellen im Rahmen eines Entzündungsprozesses zu spezifizieren. So lässt sich die Fähigkeit Dendritischer Zellen, auf einen Chemokinreiz zu reagieren und vom Ort der Entzündung zu sekundären Lymphorganen, dem Ort der T-Zell-Aktivierung, zu wandern, mit einem Migrations Assay untersuchen. In diesem Ansatz ließe sich der Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf das Migrationsvermögen der Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zu einem Ort hoher Chemokinkonzentration messen. Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass 3oxoC<sub>12</sub>-HSL über seinen Einfluss auf Dendritische Zellen die T-Zell-Antwort zugunsten von wirtsschädigenden Th1-Zellen verschiebt. Um den Einfluss von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL auf die Polarisation von T-Zellen durch Dendritische Zellen zu bestimmen, bietet sich die Cokultivierung Dendritischer Zellen mit T-Zellen in Anwesenheit von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL an. Schließlich ließe sich die tatsächliche Wirksamkeit der Hemmung des Quorum Sensing *in vivo* durch die Anwendung von 3oxoC<sub>12</sub>-HSL Inhibitoren im Tiermodel untersuchen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aris, R. M., Merkel, P. A., Bachrach, L. K., Borowitz, D. S., Boyle, M. P., Elkin, S. L., et al. (2005). Guide to bone health and disease in cystic fibrosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (Vol. 90, pp. 1888-1896).
- Balough, K., McCubbin, M., Weinberger, M., Smits, W., Ahrens, R., & Fick, R. (1995). The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 20(2), 63-70.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18, 767-811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252.
- Bennett, S., & Breit, S. N. (1994). Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *Journal of leukocyte biology*, 56(3), 236-40.
- Bennett, W. E., & Cohn, Z. A. (1966). The isolation and selected properties of blood monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 123(1), 145-60.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Jakobsen, T. H., Phipps, R., Nielsen, A. K., Rybtke, M. T., et al. (2010). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients. *PloS one*, 5(4), e10115. doi: 10.1371/journal.pone.0010115.
- Boontham, P., & Robins, A. (2008). Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. Portland Press Ltd.
- Boontham, Pisake, Robins, Adrian, Chandran, P., Pritchard, D., Cámara, M., Williams, Paul, et al. (2008). Significant immunomodulatory effects of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules: possible link in human sepsis. *Clinical science (London, England : 1979)*, 115(11), 343-51. doi: 10.1042/CS20080018.
- Boucher, R. C. (2002). An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Advanced drug delivery reviews*, 54(11), 1359-71.
- Boucher, R. C. (2004). New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 23(1), 146-58.
- Bryan, A., Watters, C., Koenig, L., Youn, E., Olmos, A., Li, G., et al. (2010). Human transcriptome analysis reveals a potential role for active transport in the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* autoinducers. *Microbes and Infection*, 12(12-13), 1042 - 1050.
- Burnet, F. M. (1959). The clonal selection theory of acquired immunity : Burnet, F. M. (Frank Macfarlane), Sir, 1899-1985
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., & Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, 388(6644), 782-7. doi: 10.1038/42030.

- Charlton, T. S., Charlton, T. S., Nys, R. de, Netting, A., Kumar, N., Hentzer, Morten, et al. (2000). A novel and sensitive method for the quantification of N-3-oxoacyl homoserine lactones using gas chromatography–mass spectrometry: application to a model bacterial biofilm. *Environmental Microbiology*, 2(5), 530 - 541.
- Chhabra, S. R., Harty, C., Hooi, D. S. W., Daykin, M., Williams, Paul, Telford, Gary, et al. (2003). Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(1), 97-104.
- Chun, C. K., Ozer, E. A., Welsh, Michael J, Zabner, J., & Greenberg, E P. (2004). Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3587-90. doi: 10.1073/pnas.0308750101.
- Colonna, M., Trinchieri, Giorgio, & Liu, Y.-J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology*, 5(12), 1219-26. doi: 10.1038/ni1141.
- Cooley, M., Chhabra, S. R., & Williams, Paul. (2008). N-Acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing: a twist in the tail and a blow for host immunity. *Chemistry & biology*, 15(11), 1141-7. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.10.010.
- Crosbie, P. A. J., & Woodhead, M. A. (2009). Long-term macrolide therapy in chronic inflammatory airway diseases. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 33(1), 171-81. doi: 10.1183/09031936.00042208.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B H, Costerton, J. W., & Greenberg, E P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5361), 295-8.
- DiMango, E., Zar, H. J., Bryan, R., & Prince, A. (1995). Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *The Journal of clinical investigation*, 96(5), 2204-10. doi: 10.1172/JCI118275.
- Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., & La Du, B. N. (2005). Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal Of Lipid Research*, 46(6), 1239-1247.
- Drenkard, E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 5(13), 1213-9.
- Döring, G., Hörz, M., Ortelt, J., Grupp, H., & Wolz, C. (1993). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Epidemiology and infection*, 110(3), 427-36.
- Engel, J., & Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 61-6. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.007.
- Erickson, D. L., Endersby, R., Kirkham, A., Stuber, K., Vollman, D. D., Rabin, H. R., et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infection and immunity*, 70(4), 1783-90.
- Eschbach, M., Schreiber, K., Trunk, K., Buer, J., Jahn, D., & Schobert, M. (2004). Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of bacteriology*, 186(14), 4596-604. doi: 10.1128/JB.186.14.4596-4604.2004.

- Fanger, N. A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., & Guyre, P. M. (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(2), 541-8.
- Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., et al. (2008). Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *The Journal of pediatrics*, 153(2), S4-S14. doi: 10.1016/j.jpeds.2008.05.005.
- Favre-Bonté, S., Pache, J.-C., Robert, J., Blanc, D., Pechère, J.-C., & Delden, C. van. (2002). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals in lung tissue of cystic fibrosis patients. *Microbial pathogenesis*, 32(3), 143-7. doi: 10.1006/mpat.2001.0487.
- Fuqua, C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 727-751.
- Gambello, M. J., & Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of bacteriology*, 173(9), 3000-9.
- Gibson. (1959). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*, 23(3), 545-9.
- Gibson, R. L., Burns, J. L., & Ramsey, B. W. (2003). Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168(8), 918-51. doi: 10.1164/rccm.200304-505SO.
- Govan, J. R., & Fyfe, J. A. (1978). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: resistance of the mucoid from to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoid variants in vitro. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 4(3), 233-40.
- Green, A., & Kirk, J. (2007). Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Annals of clinical biochemistry*, 44(Pt 1), 25-34. doi: 10.1258/000456307779596011.
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., et al. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *The Journal of experimental medicine*, 189(3), 451-60.
- Hassett, D. J., Sutton, M. D., Schurr, M. J., Herr, A. B., Caldwell, C. C., & Matu, J. O. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways. *Trends in microbiology*, 17(3), 130-8. doi: 10.1016/j.tim.2008.12.003.
- Hastings, J. W., Potrikus, C. J., Gupta, S. C., Kurfürst, M., & Makemson, J. C. (1985). Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. *Advances in microbial physiology*, 26, 235-91.
- Hemmi, H., Kaisho, Tsuneyasu, Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., et al. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature immunology*, 3(2), 196-200. doi: 10.1038/ni758.
- Hense, B. A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., & Kreft, J.-U. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature reviews. Microbiology*, 5(3), 230-9. doi: 10.1038/nrmicro1600.

- Hertz, C. J., Kiertcher, S. M., Godowski, P. J., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Roth, M. D., et al. (2001). Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(4), 2444-50.
- Hirakata, Y., Kaku, M., Mizukane, R., Ishida, K., Furuya, N., Matsumoto, T., et al. (1992). Potential effects of erythromycin on host defense systems and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36(9), 1922-7.
- Hoffmann, J. A. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*, 284(5418), 1313-1318. doi: 10.1126/science.284.5418.1313.
- Hooi, D. S. W., Bycroft, Barrie W, Chhabra, S. R., Williams, Paul, & Pritchard, David I. (2004). Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules. *Infection and immunity*, 72(11), 6463-70. doi: 10.1128/IAI.72.11.6463-6470.2004.
- Horikawa, M., Tateda, Kazuhiro, Tuzuki, E., Ishii, Y., Ueda, C., Takabatake, T., et al. (2006). Synthesis of *Pseudomonas* quorum-sensing autoinducer analogs and structural entities required for induction of apoptosis in macrophages. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 16(8), 2130-3. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.01.054.
- Horke, S., Witte, I., Altenhöfer, S., Wilgenbus, P., Goldeck, M., Förstermann, U., et al. (2010). Para-oxonase 2 is down-regulated by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone and attenuates oxidative stress induced by pyocyanin. *The Biochemical journal*, 426(1), 73-83. doi: 10.1042/BJ20091414.
- Inaba, K., Inaba, M., Witmer-Pack, M., Hatchcock, K., Hodes, R., & Steinman, R. M. (1995). Expression of B7 costimulator molecules on mouse dendritic cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 378, 65-70.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., et al. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *The Journal of experimental medicine*, 191(6), 927-36.
- Iwasaki, A., & Kelsall, B. L. (1999). I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 276(5), G1074-1078.
- Janeway, C.A., Travers, P. & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford 7. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford 7. Auflage.
- Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., et al. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European Journal of Immunology*, 27(12), 3135-3142.
- Joris, L., Dab, I., & Quinton, P. M. (1993). Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways. *The American review of respiratory disease*, 148(6 Pt 1), 1633-7.
- Kaisho, T., & Akira, S. (2001). Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta odontologica Scandinavica*, 59(3), 124-30.
- Kaisho, Tsuneyasu, & Akira, Shizuo. (2002). Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et biophysica acta*, 1589(1), 1-13.



- Kaplan, H. B., & Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *Journal of bacteriology*, 163(3), 1210-4.
- Kenneth, T. (2008). The Normal Bacterial Flora of Humans.
- Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1073-80.
- Kievit, T. de, Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 181(7), 2175-84.
- Kim, C. H. (2004). Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders*, 4(4), 343-61.
- Kisielow, P., Hirst, J. A., Shiku, H., Beverley, P. C., Hoffman, M. K., Boyse, E. A., et al. (1975). Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. *Nature*, 253(5488), 219-20.
- Kita, E., Sawaki, M., Oku, D., Hamuro, A., Mikasa, K., Konishi, M., et al. (1991). Suppression of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by erythromycin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 27(3), 273-84.
- Knowles, M. R., Robinson, J. M., Wood, R. E., Pue, C. A., Mentz, W. M., Wager, G. C., et al. (1997). Ion composition of airway surface liquid of patients with cystic fibrosis as compared with normal and disease-control subjects. *The Journal of clinical investigation*, 100(10), 2588-95. doi: 10.1172/JCI119802.
- Kravchenko, V. V., Kaufmann, G. F., Mathison, J. C., Scott, D. A., Katz, A. Z., Grauer, D. C., et al. (2008). Modulation of gene expression via disruption of NF-kappaB signaling by a bacterial small molecule. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5886), 259-63. doi: 10.1126/science.1156499.
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*, 44(2-3), 325-337. Springer Berlin / Heidelberg. doi: 10.1007/BF01959006.
- Larsen, C. P., Ritchie, S. C., Hendrix, R., Linsley, P. S., Hathcock, K. S., Hodes, R. J., et al. (1994). Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 152(11), 5208-19.
- Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A., & Steinkasserer, A. (2002). Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *International archives of allergy and immunology*, 129(2), 113-8.
- León, B., López-Bravo, M., & Ardavin, C. (2005). Monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in immunology*, 17(4), 313-8. doi: 10.1016/j.smim.2005.05.013.
- MacDonald, K. P. A., Munster, D. J., Clark, G. J., Dzionek, A., Schmitz, J., & Hart, D. N. J. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*, 100(13), 4512-20. doi: 10.1182/blood-2001-11-0097.
- Martín-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U. E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, Antonio, et al. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *The Journal of experimental medicine*, 198(4), 615-21. doi: 10.1084/jem.20030448.

- Matsui, H, Grubb, B R, Tarran, R., Randell, S H, Gatzky, J. T., Davis, C. W., et al. (1998). Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell*, 95(7), 1005-15.
- Matsui, Hirotoshi, Verghese, M. W., Kesimer, M., Schwab, U. E., Randell, Scott H, Sheehan, J. K., et al. (2005). Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(2), 1090-9.
- McAuley, D. F., & Elborn, J. S. (2000). Cystic fibrosis: basic science. *Paediatric respiratory reviews*, 1(2), 93-100. doi: 10.1053/prrv.2000.0029.
- McMenamin, C., & Holt, P. G. (1993). The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression o. *The Journal of experimental medicine*, 178(3), 889-99.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 1(2), 135-45. doi: 10.1038/35100529.
- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J. M., Dumont, X., Guillemot, J. C., Kaghad, M., et al. (1993). Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362(6417), 248-50. doi: 10.1038/362248a0.
- Miyairi, S., Tateda, Kazuhiro, Fuse, E. T., Ueda, C., Saito, H., Takabatake, T., et al. (2006). Immunization with 3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone-protein conjugate protects mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Journal of medical microbiology*, 55(Pt 10), 1381-7. doi: 10.1099/jmm.0.46658-0.
- Molinari, G., Paglia, P., & Schito, G. C. (1992). Inhibition of motility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* by subinhibitory concentrations of azithromycin. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 11(5), 469-71.
- Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H., & Littman, D. R. (1988). Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature*, 336(6194), 79-81. doi: 10.1038/336079a0.
- Nseir, S., Di Pompeo, C., Pronnier, P., Beague, S., Onimus, T., Saulnier, F., et al. (2002). Nosocomial tracheobronchitis in mechanically ventilated patients: incidence, aetiology and outcome. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 20(6), 1483-9.
- Oliver, A., Alarcón, T., Caballero, E., & Cantón, R. (2009). [Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 89-104. doi: 10.1016/j.eimc.2008.05.004.
- Ozer, E. A., Ozer, E. A., Pezzulo, A., Shih, D. M., Chun, C., Furlong, C., et al. (2005). Human and murine paraoxonase 1 are host modulators of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), 29 - 37.
- Paixão, V. A., Barros, T. F., Mota, C. M. C., Moreira, T. F., Santana, M. A., & Reis, J. N. (2010). Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *The Brazilian*

- journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 14(4), 406-9.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B H, et al. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 197-201.
- Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B H, & Greenberg, E P. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), 1490-1494.
- Pearson, J. P., Van Delden, C., & Iglewski, B H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of bacteriology*, 181(4), 1203-10.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., & Iglewski, B H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology*, 179(10), 3127-3132.
- Rajan, S., & Saiman, L. (2002). Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Seminars in respiratory infections*, 17(1), 47-56.
- Reinhardt, D. (2001). *Cystische Fibrose* (p. 611). Springer.
- Reis e Sousa, C., Sher, A., & Kaye, P. (1999). The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Current opinion in immunology*, 11(4), 392-9. doi: 10.1016/S0952-7915(99)80066-1.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., et al. (2001). N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 12), 3249-62.
- Rieser, C., Böck, G., Klocker, H., Bartsch, G., & Thurnher, M. (1997). Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *The Journal of experimental medicine*, 186(9), 1603-8.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1066-73.
- Ritchie, A J. (2003). Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infection and immunity*, 71(8), 4421-31.
- Ritchie, A J, Jansson, A., Stallberg, J., Nilsson, P., Lysaght, P., & Cooley, M A. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-3-(Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone Inhibits T-Cell Differentiation and Cytokine Production by a Mechanism Involving an Early Step in T-Cell Activation. *Infection and Immunity*, 73(3), 1648-1655. American Society for Microbiology.
- Ritchie, A J, Jansson, A., Stallberg, J., Nilsson, P., Lysaght, P., & Cooley, M A. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation. *Infection and immunity*, 73(3), 1648-55. American Society for Microbiology (ASM). doi: 10.1128/IAI.73.3.1648-1655.2005.

- Ritchie, Adam J, Whittall, C., Lazenby, J. J., Chhabra, S. R., Pritchard, David I, & Cooley, Margaret A. (2007). The immunomodulatory *Pseudomonas aeruginosa* signalling molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone enters mammalian cells in an unregulated fashion. *Immunology and cell biology*, 85(8), 596-602. doi: 10.1038/sj.icb.7100090.
- Ritchie, Adam J, Yam, A. O. W., Tanabe, K. M., Rice, S. A., & Cooley, Margaret A. (2003). Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infection and Immunity*, 71(8), 4421-4431. American Society for Microbiology.
- Rossi, M., & Young, J. W. (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(3), 1373-81.
- Saeki, H., Moore, A. M., Brown, M. J., & Hwang, S. T. (1999). Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(5), 2472-5.
- Sallusto, F, Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), 389-400.
- Sallusto, F, & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, 179(4), 1109-18.
- Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A., et al. (2004). Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of medical microbiology*, 53(Pt 9), 841-53.
- Schechter, M. (2008). Patient Registry Analyses: Seize the Data, but Caveat Lector. *The Journal of Pediatrics*, 153(6), 733-735. doi: 10.1016/j.jpeds.2008.09.011.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T., & Greenberg, E P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of bacteriology*, 185(7), 2066-79.
- Schwarzmann, S., & Boring, J. R. (1971). Antiphagocytic Effect of Slime from a Mucoid Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 3(6), 762-7.
- Sheppard, D. N., & Welsh, M J. (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological reviews*, 79(1 Suppl), S23-45.
- Shiku, H., Kisielow, P., Bean, M. A., Takahashi, T., Boyse, E. A., Oettgen, H. F., et al. (1975). Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell-mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface phenotype of T cells. *The Journal of experimental medicine*, 141(1), 227-41.
- Shortman, K., & Liu, Y. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*, 2(3), 151-61. doi: 10.1038/nri746.

- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., et al. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5421), 1835-7.
- Skindersoe, M. E., Zeuthen, L. H., Brix, S., Fink, L. N., Lazenby, J., Whittall, C., et al. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 55(3), 335-345.
- Steidle, A., Allesen-Holm, M., Riedel, Kathrin, Berg, G., Givskov, Michael, Molin, Søren, et al. (2002). Identification and characterization of an N-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6371-6382. American Society for Microbiology.
- Steinbrink, K., Paragnik, L., Jonuleit, H., Tüting, T., Knop, J., & Enk, A. H. (2000). Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins. *Archives of dermatological research*, 292(9), 437-45. doi: 10.1007/s004030002920437.403.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology*, 9, 271-96. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415.
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5), 1142-62.
- Strober, W., Kelsall, B., & Marth, T. (1998). Oral tolerance. *Journal of clinical immunology*, 18(1), 1-30.
- Svediene, S., & Ivaskevicius, J. (2006). [Actualities of adults' ventilator-associated pneumonia]. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 42(2), 91-7.
- Tarran, R., Grubb, B R, Gatzky, J. T., Davis, C. W., & Boucher, R C. (2001). The relative roles of passive surface forces and active ion transport in the modulation of airway surface liquid volume and composition. *The Journal of general physiology*, 118(2), 223-36.
- Tateda, Kazuhiro, Ishii, Y., Horikawa, M., Matsumoto, Tetsuya, Miyairi, S., Pechere, J. C., et al. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infection and immunity*, 71(10), 5785-93.
- Tateda, Kazuhiro, Ishii, Y., Kimura, S., Horikawa, M., Miyairi, S., & Yamaguchi, Keizo. (2007). Suppression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems by macrolides: a promising strategy or an oriental mystery? *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 13(6), 357-67. doi: 10.1007/s10156-007-0555-2.
- Telford, G, Wheeler, D., Williams, P, Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., et al. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infection and immunity*, 66(1), 36-42.
- Thurner, B., Röder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., et al. (1999). Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *Journal of immunological methods*, 223(1), 1-15.
- Théry, C. (2001). The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), 45-51. doi: 10.1016/S0952-7915(00)00180-1.

- Tingpej, P., Smith, L., Rose, B., Zhu, H., Conibear, T., Al Nassafi, K., et al. (2007). Phenotypic characterization of clonal and nonclonal *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, 45(6), 1697-704. doi: 10.1128/JCM.02364-06.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*, 3(2), 133-46. doi: 10.1038/nri1001.
- Villablanca, E. J., Zhou, D., Valentini, B., Negro, A., Raccosta, L., Mauri, L., et al. (2008). Selected natural and synthetic retinoids impair CCR7- and CXCR4-dependent cell migration in vitro and in vivo. *Journal of leukocyte biology*, 84(3), 871-9. doi: 10.1189/jlb.0108047.
- Wagner, C., Zimmermann, S., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U., et al. (2007). The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(2), 481-7. doi: 10.1007/s00216-006-0698-5.
- Wagner, V. E., Bushnell, D., Passador, Luciano, Brooks, A. I., & Iglewski, Barbara H. (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *Journal of bacteriology*, 185(7), 2080-95.
- Wanner, A., Salathé, M., & O'Riordan, T. G. (1996). Mucociliary clearance in the airways. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 154(6 Pt 1), 1868-902.
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology*, 21, 319-46. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001.
- Weyrich, A. S., Elstad, M. R., McEver, R. P., McIntyre, T. M., Moore, K. L., Morrissey, J. H., et al. (1996). Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *The Journal of clinical investigation*, 97(6), 1525-34. doi: 10.1172/JCI118575.
- Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., et al. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860-4. doi: 10.1038/35101627.
- Wilder, C. N., Allada, G., & Schuster, M. (2009). Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infection and immunity*, 77(12), 5631-9. American Society for Microbiology (ASM). doi: 10.1128/IAI.00755-09.
- Wilson, R., & Dowling, R. B. (1998). Lung infections. 3. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species. *Thorax*, 53(3), 213-9.
- Yates, E. A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., et al. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 70(10), 5635-46.
- Yoon, S. S., & Hassett, D. J. (2004). Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis airway disease: metabolic changes that unravel novel drug targets. *Expert review of anti-infective therapy*, 2(4), 611-23.
- Zheng, T., Zhu, Z., Wang, Z., Homer, R. J., Ma, B., Riese, R. J., et al. (2000). Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *The Journal of clinical investigation*, 106(9), 1081-93. doi: 10.1172/JCI10458.

- Zhou, L. J., & Tedder, T. F. (1995). Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(8), 3821-35.
- Zimmermann, S., Wagner, C., Müller, W., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., et al. (2006). Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infection and immunity*, 74(10), 5687-92. doi: 10.1128/IAI.01940-05.
- Zinkernagel, R. M., & Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(450), 701-2.
- Zobywalski, A., Javorovic, M., Frankenberger, B., Pohla, H., Kremmer, E., Bigalke, I., et al. (2007). Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *Journal of translational medicine*, 5, 18. doi: 10.1186/1479-5876-5-18.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(4), 533-616.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich folgenden Personen sehr herzlich danken:

Meiner Doktormutter, PD Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann, für das spannende Thema, für ihre großartige Unterstützung, Wohlwollen und Förderung; für die Anregungen und für ihre Geduld bei der endgültigen Fertigstellung; für ihre Diskussionsbereitschaft und ihr stets offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen.

Meiner Arbeitsgruppe im Kubus der Dr. Von Haunerschen Kinderspitals: Doktoros Tatiana Binder, Nikola Schulz, Inge Müller und Susanne Harner, und Gabriele Heilig für das sehr angenehme und freundliche Arbeitsklima.

Tatli, für ihre unendliche Hilfsbereitschaft, Herzlichkeit und tolle Zusammenarbeit. Super-Nikl für ihre unerschöpfliche, tatkräftige physische (Fischsuppe und Plätzchen) und psychische Unterstützung in allen Phasen meines Projekts. Inge Müller, und noch einmal Tatli und Nikl, für die ausgelassenen gemeinsamen Mittagessen, die nobelpreisträchtigen Diskussionen und die heimische Arbeitsatmosphäre.

Der ehemaligen Doktorandin in der klinischen Kooperationsgruppe, Dr. med. Anastasia Schneider, für das sorgfältige Einarbeiten in die Komplexitäten der Zellkultur.

Der Leiterin des Instituts für molekulare Immunologie, Prof. Dr. Dolores Schendel, für die vielen Anregungen, Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Anton Hartmann, Dr. Michael Schmid und Dr. Michael Rothballer, für ihre große Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen und methodischen Fragen.

Den vielen lieben, freiwilligen Spendern, die mir bereitwillig ihr Blut zur Verfügung gestellt und mich mit ihren Zellen experimentieren lassen haben.



Meinen Freunden, Doktor Michael Wenzel, Benedikt Schwaiger, Claudia Summo, und vielen mehr, für ihre Anregungen, Motivation und Unterstützung auf dem nicht immer ebenen Weg durch das Medizinstudium und zum Titel.

Meinem Lebensgefährten David, der mich stets liebevoll und entschieden unterstützt, und der niemals müde wird, mir seine Schulter zum Anlehnen und seine Hand zum Halten anzubieten.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern und Brüdern, für ihre grenzenlose Unterstützung und Geduld, die anregenden philosophischen Gespräche und ihren unbeirrten Glauben an mich. Ohne ihre Förderung und Liebe wäre mir das Medizinstudium und die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

## Publikation

**Binder, T. & Bernatowicz, R., Noessner, E., Rothballer, M., Schmid, M., Griese, M., Schendel, D. J., Hartmann, A. & Krauss-Etschmann, S.:** 3oxoC12-Homoserinlactone from *Pseudomonas aeruginosa* impairs dendritic cell functions. (In Bearbeitung)

## Poster

**Binder, T., Bernatowicz, R., Noessner, E., Rothballer, M., Schmid, M., Schendel, D. J., Hartmann, A. & Krauss-Etschmann, S. (2009):** The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer *N*-(3-oxododecanoyl)-HSL inhibits dendritic cell functions. 9<sup>th</sup> Annual Meeting of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), San Francisco, CA, USA.

**Binder, T., Bernatowicz, R., Noessner, E., Rothballer, M., Schmid, M., Schendel, D. J., Hartmann, A. & Krauss-Etschmann, S. (2009):** Das Homoserinlacton *N*-(3-oxododecanoyl) von *Pseudomonas aeruginosa* inhibiert die Funktion humaner dendritischer Zellen. 31. Jahrestag der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie e.V., Düsseldorf, Deutschland.

**Bernatowicz, R., Binder, T., Schneider, T., Schendel, D. J., Hartmann, A. & Krauss-Etschmann, S. (2008):** Effects of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserinelactone on human dendritic cells. Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI), Wien, Österreich.

**Binder, T., Bernatowicz, R., Rothballer, M., Schmid, M., Krauss-Etschmann, S., Schendel, D. J. & Hartmann, A. (2007):** Quantitation of live versus dead probiotic bacteria. 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, Deutschland.

**Schneider, A., Binder, T., Bernatowicz, R., Zobywalski, A., Falk, C., Hartmann, A., Schendel, D. J. & Krauss-Etschmann, S. (2007):** Modulation of human dendritic cells by UV-inactivated and live probiotic bacteria. 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, Deutschland.

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

München, den 12. Juni 2013

Rodica Bernatowicz